

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

ANALYTISCHE METHODEN ZUR EXTRAKTION UND
TRENNUNG DER FREIEN NUKLEOTIDE VON HEFE
UND IHRE ANWENDUNG ZUR CHARAKTERISIERUNG
VON VERÄNDERUNGEN DES NUKLEOTIDPOOLS BEI
ZELLWACHSTUM UND ZELLVERMEHRUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

KARL-HEINZ PFLÜGER

aus Homberg (Efze)

Marburg 1975

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

ANALYTISCHE METHODEN ZUR EXTRAKTION UND
TRENNUNG DER FREIEN NUKLEOTIDE VON HEFE
UND IHRE ANWENDUNG ZUR CHARAKTERISIERUNG
VON VERÄNDERUNGEN DES NUKLEOTIDPOOLS BEI
ZELLWACHSTUM UND ZELLVERMEHRUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg



vorgelegt von

KARL-HEINZ PFLÜGER

aus Homberg (Efze)

Marburg 1975



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 7. Juli 1975
Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen
Referent: Prof. Dr. med. W. Schmid
Correferent: Prof. Dr. med. W. Kunz

Diese Arbeit wurde zwei Jahre durch ein Graduierten-
stipendium gefördert.

Meinen Eltern und meiner Frau Christa
gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung	5
2. Material und allgemeine Methoden	5

T e i l A

3. Versuche zum Nachweis der diphenylamin-positiven Substanzen in sauren Hefezell-extrakten	12
3.1. Experimentelles	12
3.2. Ergebnisse	13
3.2.1. Eigenschaften und Vorkommen der störenden Gelbfärbung	13
3.2.2. Versuche zur Elimination der störenden Substanzen	17
3.2.2.1. Ergebnisse und Diskussion	20

T e i l B

4. Papierchromatographische Trennungsmöglichkeiten der sauren Extrakte	24
5. Hochvoltelektrophoretische Trennversuche	27
5.1. Experimentelles	28
5.2. Ergebnisse und Diskussion	33
6. Übersicht über DC- und säulenchromatographische Trennverfahren	36
7. Versuche zur Trennung von Nukleotidgemischen und sauren Hefezell-extrakten über PEI-Zellulosesäulen	39
7.1. Kapazitätsbestimmung der PEI-Zellulose	40
7.2. Vorbereitung des Anionenaustauschers und der Säulen	42
7.3. Trennungen über die Säule A	44
7.3.1. Ergebnisse mit der Säule A	44
7.4. Trennungen über die Säule B	46
7.4.1. Trennungen mit 3 Gradienten unterschiedlicher Steigung	46
7.4.2. Trennungen mit konkaven Gradienten	47
7.4.2.1. Ergebnisse verschiedener konkaver Gradienten	48

7.5.	Die Identifikation der Peaks von Hefechromatogrammen und die Lokalisation wichtiger Reinsubstanzen im Elutionsprofil	52
7.6.	Bisher bekannte Eigenschaften des Hefepaks 19	55
7.7.	Die Beständigkeit der Di- und Triphosphatderivate während eines Trennvorganges	61
7.8.	Diskussion zur Anwendbarkeit dieser säulenchromatographischen Methode	61
8.	Die Anwendung der Säule zu analytischen Untersuchungen unterschiedlich vorbehandelter, saurer Hefeextrakte	66
8.1.	Der Einfluß verschiedener Ernteverfahren auf die Zusammensetzung der Hefezell-extrakte	68
8.1.1.	Experimentelles	68
8.1.2.	Ergebnisse und Diskussion	70
8.2.	Der Einfluß von Lagerungsbedingungen von Hefezellen und Extrakten auf die Extraktzusammensetzung	77
8.2.1.	Die Lagerungsbedingungen der Hefezellen	78
8.2.2.	Die Lagerungsbedingungen der Hefeextrakte	80
8.3.	Der Einfluß von Extraktions- und Neutralisationsbedingungen auf die Extraktzusammensetzung	84
8.4.	Veränderungen der Extraktzusammensetzung, hervorgerufen durch die Neutralisation in Gegenwart der Hefezellen	98
8.5.	Die Zusammensetzung der Nachextrakte	101
9.	Zusammenfassung der Ergebnisse des Teils B	102

T e i l C

10.	Untersuchung der säurelöslichen Hefezell-extrakte in Abhängigkeit von Wachstum und Vermehrung	106
10.1.	Die Einwirkung verschiedener Wachstumsbedingungen auf die Synthese von RNS, DNS und der uv-absorbierenden säurelöslichen Zellbestandteile	106
10.1.1.	Unterschiedliche Ausgangskonzentration der Hefe im Nährmedium	107
10.1.2.	Variationen der Nährstoffzugabe	111
10.1.3.	Der Einfluß der einzelnen Vitamine	112
10.2.	Die Fraktionierung der in Abhängigkeit von Wachstum und Vermehrung gewonnenen säurelöslichen Extrakte mit Hilfe der PEI-Zellulosesäule	113

10.2.1.	Quantitative Veränderungen der Extraktzusammensetzung bei Wachs- tum und Vermehrung	113
10.2.2.	Die Markierung der Pyrimidinderivate mit ^3H -Uracil	117
10.2.3.	Diskussion der Ergebnisse	120
11.	Zusammenfassung	129
	Literaturverzeichnis	132

1. EINLEITUNG

Wachstum und Bestandserhaltung eines lebenden Organismus sind geprägt von der durch Regulationsmechanismen gesteuerten Synthese von DNS, RNS und Proteinmolekülen in seinen Einzelzellen. Diese Syntheseleistungen der Einzelzelle sind während des Lebens keine fließenden, kontinuierlich ablaufenden Vorgänge, sondern fast ausschließlich sich rhythmisch wiederholende, biochemische Prozesse. Die einzelnen voneinander abhängigen Syntheserhythmen sind untereinander eng verflochten und überlappen sich gegenseitig (vgl. DIFFUS, 1971).

Grundsätzlich ist es möglich, für jeden rhythmisch gebildeten oder aktiven Bestandteil der Zelle einen eigenen Zyklus zu statuieren. Bedingt durch seine einschneidenden morphologischen und biochemischen Veränderungen legt man jedoch für die Einteilung von Phasen allgemein den Zyklus der Zellteilung zugrunde und ordnet alle anderen Stoffwechselrhythmen in diesen elementaren Vorgang ein (vgl. WILLIAMSON, 1965, DIFFUS, 1971).

Eine geordnete und vom Gesamtorganismus streng kontrolliert ablaufende Zellteilung ist Voraussetzung für die biologische Entwicklung aller Lebewesen. Die Regulationsmechanismen und Faktoren, die diesen Vorgang initiieren, aufrecht erhalten und wieder blockieren, sind für Medizin, Pharmakologie und Biochemie gleichermaßen interessant und bedeutend. Um die zellulären Grundvorgänge möglichst einfach und mit großer Effektivität studieren zu können, ist die Verwendung von synchron wachsenden Einzelzellen sowie die Dissoziation (vgl. ECKSTEIN, 1966, MITCHISON) der ineinandergreifenden Zyklen von essentieller Bedeutung.

Durch eine von SCHMID et al. (13) entwickelte Methode gelingt es, durch fraktioniertes Zentrifugieren von in isotoner Lösung suspendierter Bäckerhefe synchron wachsende Zellen zu gewinnen. Der Synchronisationsgrad ist für Selektionssynchronisation außerordentlich hoch und mit Induktionsverfahren durchaus vergleichbar (s. WORTBERG, HAERTEL, LANGBEHN). Durch Zusatz der Vitamine B₁, B₆ und Biotin gelingt es bei diesen Hefezellen, den Übergang von einer Lag-Phase in die S-Phase des Zellzyklus zu induzieren. Dieses Modell erlaubt somit die Untersuchung der Vermehrungsmechanismen an synchron wachsenden Zellen, getrennt von verschiedenen Wachstumsleistungen.

Die Arbeiten von HAERTEL, LANGBEHN und BRAUN beschäftigten sich vornehmlich mit der Verteilung und Synthese von RNS-Fractionen unter diesen Bedingungen. Es werden hier interessante Verschiebungen von D-RNS zu ribosomaler und zeitlich verschieden große Syntheseraten der einzelnen Fractionen beschrieben. HAERTEL fand, daß kurz vor Beginn der Sprossung und der S-Phase die niedermolekularen RNS-Fractionen sowie die hochmolekulare D-RNS besonders intensiv umgesetzt wurden. Dies wurde im Zusammenhang mit einer hohen Genaktivität gesehen.

Der Einfluß der drei, die Zellteilung initiiierenden Vitamine auf die Zusammensetzung der sauren Zellextrakte, insbesondere die Nukleinsäurebausteine, ist vermutlich von elementarer Bedeutung für das Zustandekommen des zur S-Phase überleitenden Effektes. Die Mitteilungen von ECKSTEIN, 1971, DIFFUS, 1971, und BJURSELL et al., 1973, sowie die Ergebnisse weiterer Arbeiten (Lit. 8, 15, 80, 81, 82, 120) belegen die bedeutende Rolle, die das ausgeglichene Zusammenspiel der verschiedenen Nukleotide für den Zellzyklus, besonders den Anstoß zu der DNS-Synthese, darstellt.

Die Anwesenheit von Biotin ist für elementare Stoffwechselvorgänge, wie z. B. den Aminosäurestoffwechsel (s. MOAT et al., 1965 und 1969) und davon abhängig die Synthese verschiedener Enzyme (vgl. AHMAD, 1962) sowie die Synthese der Purin- (vgl. MOAT, 1960) und Pyrimidinnukleotide (hierzu ist die Anwesenheit von Karbamoylphosphat Voraussetzung (vgl. WELLNER et al., 1968)) essentiell. Die Beteiligung dieses Vitamins an der Bereitstellung von brauchbaren und funktionstüchtigen Membran- und Zellwandbausteinen wird von DIXON et al., 1964, und DUNWELL et al., 1962, belegt. Unter Berücksichtigung der Bedeutung von Biotin für die beschriebenen Stoffwechselwege sowie die Befunde von COMINGS et al., 1968, LARKS, 1969, und der Arbeiten (Lit.: 8, 20, 59, 96, 113) lassen Einwirkungen von Biotin auf die Größe der einzelnen Nukleotidpools und vor allem auf den Übergang der Zellen in die S-Phase erwarten.

Hieraus ergibt sich die Fragestellung dieser Arbeit. Sie soll unter den Bedingungen des synchronen Wachstums von Hefezellen im Minimalmedium und der spezifischen Induktion der DNS-Replikation durch das Vitamingemisch einen Beitrag zur Analytik von sauren Zellextrakten und zur Auffindung der die DNS-Synthese initiiierenden Faktoren und Zusammenhänge leisten. Der methodische Teil der Arbeit mußte besonders stark berücksichtigt werden, da uns für Routineuntersuchungen kein bekanntes Analysenverfahren für quantitative Bestimmungen ausreichend genau und reproduzierbar erschien.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befaßt sich mit der Möglichkeit, die Desoxyribosederivate der sauren Extrakte mit Hilfe der Diphenylamin-Reaktion quantitativ zu erfassen. Es wird dabei auf eine charakteristische Störung der Farb-reaktion und Versuche, diese Störung zu beseitigen, eingegangen.

Im zweiten Teil werden die Erarbeitung einer geeigneten Trenn-

methode der Rohextrakte und die Veränderungen der Extraktzusammensetzung, die durch verschiedenartiges Aufarbeiten hervorgerufen werden, beschrieben.

Die mit Hilfe der entwickelten Methodik ermittelten Variationen der Extraktzusammensetzung in Abhängigkeit von Wachstum und Vermehrung werden im letzten Teil abgehandelt.

2. MATERIAL UND ALLGEMEINE METHODEN

I. Material und Lösungen

- 1) UDP-Glucose, ADP-Glucose, NAD, NADP, ApA, Riboflavin, Riboflavin-5-PO₄, Folsäure, UDP-Glucuronat, Coenzym A sowie alle verwendeten Basen, Nukleoside und Nukleotide (Fa. Boehringer, Mannheim).
- 2) OMP (Fa. Calbiochem, Luzern), Adenosintetraphosphat⁺).
- 3) 6-³H-Uracil (25000 mCi/mmol) (Fa. Amersham Buchler, Braunschweig).
- 4) Acetyl-CoA: Herstellung im eigenen Labor nach SIMON et al., 1953.
- 5) Pyrimidin-Oligonukleotide: Darstellung im eigenen Labor aus Lachssperma-DNS nach SHAPIRO, 1968.
- 6) PEI-Zellulose für die Säulenchromatographie sowie alle anderen Chemikalien wurden - falls verfügbar - in pA-Qualität von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.
- 7) H₂O: Für alle Zwecke wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Lediglich die isotone Kochsalzlösung und die Nährmedien wurden mit demineralisiertem Wasser bereitet.
- 8) Membranfilter; 3,0 µ, Durchmesser 40 mm bzw. 150 mm (Fa. Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen).
- 9) Chromatographiepapiere: Whatman 3 MM, Whatman ET 31 Chroma (Fa. Hormuth-Vetter, 6908 Wiesloch).

⁺) Wurde freundlicherweise von Herrn Prof. R. Schulte-Hermann, Institut für Toxikologie und Pharmakologie Marburg, zur Verfügung gestellt.

10) Hefen:

Es wurde der einheitlich diploide Stamm *Saccharomyces cerevisiae* verwendet (Fa. Moormann, Horne/Westf.).

Im Teil A der Arbeit wurden auch folgende Hefen untersucht:

- a) Pelser Hefe,
- b) Monheimer Edelhefe (Fa. Rheinische Presshefe und Spritwerke GmbH).

11) Vitamin- und Nährstoffgemische:

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 1000 ml Wachstumsansatz alternativ zugesetzt:

- a) 2 ml Vitamin B₁-Lösung (10^{-3} mg %)
2 ml Vitamin B₆-Lösung (10^{-3} mg %)
2 ml Biotinlösung (10^{-4} mg %)
- b) 150 ml frischer Hefekochsaft. Herstellung s. LANGBEHN, 1972.

12) Nährmedien:

Routinemäßig wurde das modifizierte Nährmedium nach WILLIAMSON verwendet (s. LANGBEHN, 1972).

Im Teil A wurden auch Versuche mit dem Nährmedium nach HILZ et al., 1964, durchgeführt. Die Vitamine B₁, B₆ und Biotin waren nicht darin enthalten, da sie je nach Versuchsanordnung später zugesetzt wurden.

13) Diphenylamin-Reagens:

Eisessig	200 ml
Konzentrierte Schwefelsäure	3 ml
Diphenylamin	3 g
Acetaldehyd	16 mg

Das Reagens wird jeweils frisch bereitet.

14) Orcin-Reagens:

12 N HCl	100 ml
6 %ige alkoholische Orcinlösung	3,5 ml
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100 mg

Das Reagens wird frisch bereitet.

15) Puffer für die Papierchromatographie:

Laufmittel I nach VANDERHEIDEN, 1968:

Isobuttersäure / 1 N NH_4OH / 0,1 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (pH 8.2)
(50 / 30/ 0,8)

16) Puffer für die Hochvoltelektrophorese:

Puffer I: nach SILVER et al., 1970.

0,015 M Trinatriumcitrat

0,04 % $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, pH 4.05

Puffer II: nach KLOUWEN, 1962.

Pyridin 10 ml

Eisessig 100 ml

H_2O ad 1000 ml, pH 3.6.

II. Apparaturen und allgemeine Methoden:

- | | |
|--|-----------------------------|
| 1. Wasserbad Typ 3047 | (Fa. J. Köttermann KG) |
| 2. PH-Meter Typ 100 und Typ 350 | (Fa. Knick) |
| 3. Rührwerk Typ E 60 | (Fa. Heidolph Elektro KG) |
| 4. Exzenterzelmühle Typ V 1 | (Fa. Bühler, Tübingen) |
| 5. Mikropumpen DBGM Nr. 1824962 | (Fa. Bühler, Tübingen) |
| 6. Christzentrifuge Typ UJ 1 S
und Typ UJ 3 | (Fa. Christ, Osterode/Harz) |
| 7. Stockzentrifuge Nr. 3019 | (Fa. W. Stock, Marburg) |
| 8. Gefriertrocknungsanlage | (Fa. F. Kniese, Marburg) |

9. Zur Extinktionsmessung im sichtbaren und im UV-Bereich wurde das Spektralphotometer PMQ II (Fa. C. Zeiss, Oberkochen/Württ.) verwendet.
Es wurde bei den entsprechenden Wellenlängen gegen reines Lösungsmittel bzw. den Reagensblindwert gemessen.
10. Die Spektren wurden mit dem registrierenden Spektralphotometer DMR 21 (Fa. C. Zeiss, Oberkochen/Württ.) aufgenommen.
11. Zur Hochvoltelektrophorese wurde das Gerät HVE Modell L 24 (Fa. Shandon, London) eingesetzt. Die Kühlung wurde über eine leistungsfähige Umwälzpumpe durch einen Ultra-Kryomat TK 30 (Fa. Meßgeräte-Werk Lauda) gewährleistet. Die Temperatur der den Kühler der Elektrophoreseanlage verlassenden Flüssigkeit konnte über ein eintauchendes Thermometer ständig kontrolliert werden.
12. Die Überwachungschromatogramme der Säulenchromatographie wurden je nach Versuchsanordnung mit folgenden Überwachungsanlagen aufgezeichnet:
 - a) LKB Uvicord Typ 4701 A
+ LKB Sechskanalpunktdruckschreiber Typ 6520 H (Fa. LKB Produkter AB, Stockholm),
 - b) Spektralphotometer PMQ II mit Spaltautomatik, Küvettenautomatik, TE-Wandler und Wellenlängenantrieb (Fa. C. Zeiss, Oberkochen/Württ.),
+ 12-Kanal-Punktdruckschreiber Polycomb (Fa. Hartmann & Braun AG, Frankfurt (Main)).
13. Fraktionssammler:
LKB 7000 A Ultra-Rac (Fa. LKB Produkter AB, Stockholm).

14. Die planimetrische Auswertung der Überwachungs- chromatogramme.

- a) Die mit der Überwachungsanlage 12a registrierten Transmissionsspektren wurden bei gleicher Zeitachse ($1 \text{ h} \hat{=} 3 \text{ cm}$) von Hand mit Hilfe einer TE-Tabelle in Extinktionsspektren umgezeichnet. Dabei entsprach der Extinktionswert $E = 0,1$ gleich 5 cm der gewählten Extinktionsskala. Für einen symmetrischen Peak wurden je 7 markante Punkte herausgegriffen. Die Grundlinienabsorption wurde jeweils subtrahiert.
- b) Die Apparatur 12b registrierte die Extinktionswerte der Eluate von jeweils zwei Säulen bei 280 nm und 260 nm gegen eine 1 M Kochsalzlösung. Die Bandbreite des Schreibers war über den TE-Wandler von $E = 0 - 0,5$ eingestellt ($E 0,1 = 4,5 \text{ cm}$). Der Papiervorschub betrug 4 cm/h.

Die Extinktionskurven wurden auf Diamant-Entwurfblockpapier, Best.-Nr. 622441 der Fa. C. Schleicher & Schüll, Einbek, durchgepauscht, ausgeschnitten und auf einer Analysenwaage gewogen.

15. Radiochemische Messungen:

Die Radioaktivitätsmessungen wurden in einem Flüssigkeitsszintillationszähler Mark I (Fa. Nuclear Chicago) vorgenommen. Zur Messung der tritiummarkierten Proben war der Kanal A für Tritium, der Kanal C für den externen ^{131}Ba -Standard zur Zählung nach der 'balance-point'-Methode optimal eingestellt.

Der Berechnung der dpm-Werte wurde der Quench-Korrekturfaktor zugrunde gelegt. Die Quenchkorrekturkurven wurden nach der Kanalverhältnismethode unter Verwendung des externen Standards mit ^3H -Toluol-Standardlösungen durch Zumischen der bei den zu messenden Proben vorliegen, quencheden Salzlösung aufgestellt.

Von den zu messenden Säuleneluat und Hydrolysaten wurden je 1,00 ml in Kunststoff-Fläschchen überführt und mit 10,0 ml Szintillatorflüssigkeit nach BRAY, 1960, vermischt.

16. Herstellung von kleinen Zellen:

Die Synchronisation der Hefezellen wurde durch Auswahl gleich großer Zellen durch wiederholtes Zentrifugieren in isotoner Kochsalzlösung nach SCHMID et al. (vgl. STOSSEK und LANGBEHN) in der Modifikation von BRAUN (13) vorgenommen.

17. Standardwachstumsbedingungen:

Die synchronisierten Hefezellen werden 0,1 %ig im modifizierten Nährmedium nach WILLIAMSON (1960) suspendiert und mit Hilfe eines Thermostaten auf 30° C temperiert. Die Suspension wird in einem ausreichend großen Becherglas, das mit Aluminiumfolie abgedeckt ist, durch einen elektrisch betriebenen Propeller von 10 cm Durchmesser und einen 4 cm langen Magneten in intensiver Bewegung gehalten. Während der gesamten Versuchsdauer wird die Hefe durch zwei Membranpumpen der Fa. Triumph, die Luft durch eine am Boden des Inkubationsgefäßes angebrachte G3-Glasfritte (d = 6 cm) pumpen, ausreichend mit Sauerstoff versorgt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wird das Nährstoffgemisch zugesetzt.

18. Standarderntebedingungen:

Mit Hilfe einer entsprechenden Vollpipette werden zu angegebenen Zeitpunkten jeweils von gleicher Stelle des Inkubationsgefäßes Proben entnommen. Die Hefezellen werden über einem - je nach Menge - verschiedenen großen Membranfilter (s.o.) von der Nährlösung getrennt, dreimal mit je 10 ml eiskaltem Wasser gewaschen und mit einem Spatel sorgfältig vom Filter

entfernt. Das Erntegewicht wird ermittelt und die Hefe sofort mit dem Extraktionsmittel versetzt. Im Teil B werden andere Ernteverfahren beschrieben. Abweichungen von den Standardbedingungen werden im Einzelfall genau angegeben.

19. Die säurelöslichen Zellextrakte:

Die geerntete Hefe wird bei 2° C unter ständigem Rühren mit der entsprechenden Menge 0,6 N Perchlorsäure (im Teil A auch mit 0,6 N Trichloressigsäure = TCA) 15 Minuten lang extrahiert. Der Heferückstand wird durch einstündige Zentrifugation im Kühlraum (2° C) abgetrennt. Der Überstand wird als säurelöslicher Extrakt bezeichnet.

20. Die DNS- und RNS-Bestimmung.

Der nach Extraktion der säurelöslichen Zellbestandteile verbleibende Heferückstand wird dreimal mit je 5 ml eines Gemisches aus Aethanol-Aether (3:1) gewaschen. Hierauf wird mit 5,00 ml 0,6 N Perchlorsäure für 30 Minuten bei 100° C hydrolysiert und scharf abzentrifugiert.

Zur DNS-Bestimmung werden 1,00 ml des Hydrolysates mit 2,00 ml Diphenylamin-Reagens vermischt und nach 18-stündiger Inkubation bei 30° C bei 578 nm gegen einen Reagensblindwert photometriert (BURTON, 1956).

Der RNS-Gehalt wurde nach der Methode von MEJBAUM, 1939, bestimmt. Hierzu werden, 0,20 ml des Hydrolysates mit 1,80 ml Wasser verdünnt und mit 2,00 ml Orcin-Reagens 10 Minuten bei 80° C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird bei 665 nm gegen einen Reagensblindwert photometriert.

TEIL A

3. Versuche zum Nachweis der diphenylamin-positiven Substanzen in sauren Hefezelleextrakten

Von mehreren Arbeitskreisen (Lit.: 15, 43, 80, 81, 82, 120) wurden an Hefezellen, Bakterien, Seeigel- und Froscheiern sowie an Rattenlebern zum Teil starke, zellzyklusabhängige Schwankungen im Gehalt an Desoxyribonukleotiden beobachtet. Diese Nukleotidderivate sammeln sich vor der DNS-Reduplikation vermehrt an. Über das quantitative Ausmaß und die zeitliche Ausdehnung dieses Vorganges werden sehr uneinheitliche Ergebnisse beschrieben. Während der S-Phase wird dieser Pool wieder weitgehend abgebaut.

ECKSTEIN, 1971, untersuchte an durch ein Induktionsverfahren synchronisierten Hefezellen die Veränderung des Desoxyribonukleotidpools mit Hilfe der Diphenylamin-Reaktion. Angeregt durch dieses anscheinend sehr einfache Verfahren und die beschriebenen Ergebnisse versuchten wir in gleicher Weise, den Spiegel der DNS-Bausteine in Abhängigkeit von Wachstum und Vermehrung zu analysieren.

3.1. Experimentelles

Synchronisierte Hefezellen wurden unter Standardbedingungen im modifizierten Nährmedium nach WILLIAMSON oder HILZ wachsen lassen. Das Vitamingemisch setzten wir nach 3 Stunden zu. Die Hefe wurde - wie im methodischen Teil beschrieben - geerntet und bei -20°C eingefroren. Zur Extraktion der säurelöslichen Zellbestandteile verwendeten wir 4,00 ml 0,6 N Perchlorsäure (in einzelnen

Fällen auch 0,6 N TCA). 1,00 ml des säurelöslichen Extraktes wurde nach BURTON bzw. DISCHE analysiert. Aus dem Heferückstand wurde der Gehalt an DNS bestimmt. Um zellzyklusbedingte Störmöglichkeiten der Desoxy-ribosebestimmung zu eliminieren, untersuchten wir für alle Versuche mindestens 10 Proben eines Wachstumsversuches.

3.2. Ergebnisse:

Schon zu Beginn der Untersuchungen stellte sich heraus, daß die Analysen der sauren Extrakte durch eine bestehende Gelbfärbung stark gestört wurden. Das Reaktionsprodukt der Diphenylamin-Reaktion waren nicht blau, sondern schmutzig grün gefärbt. Es wurde daher zunächst versucht, sowohl die Eigenschaften der Gelbfärbung als auch die Bedingungen, unter denen sie verstärkt auftritt, näher kennenzulernen. Nach Auswertung einer großen Zahl von Versuchen - das Zahlenmaterial kann am Pharmakologischen Institut Marburg eingesehen werden - und Absorptionsspektren kann folgendes zu diesem Punkt festgestellt werden:

3.2.1. Die Eigenschaften der störenden Gelbfärbung

Die gelbe Eigenfarbe der sauren Hefezelleextrakte tritt auch bei sehr konzentrierten Extraktionen nur bei der ersten Extraktion auf. Sämtliche Nachextrakte sowie das Nukleinsäurehydrolysat weisen diese Verfärbung nicht auf. Sie findet sich zu verschiedenen Stadien des Zellzyklus mit gleichem Absorptionsspektrum. Die Konzentration der Farbstoffe ist dem Hefegewicht proportional. Das Absorptionsspektrum im Vergleich zum Spektrum von Riboflavin ist aus Abb. 1 zu sehen.

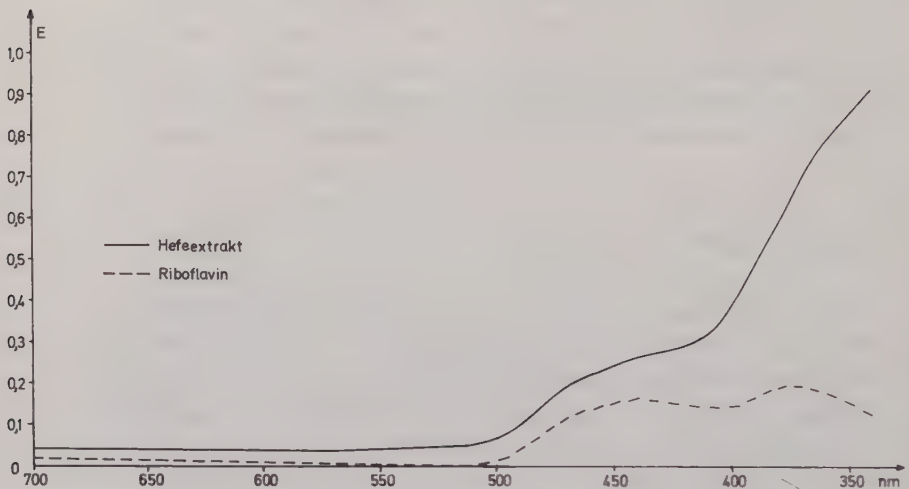


Abb. 1: Die Absorptionsspektren des gelbgefärbten Hefeextraktes und einer Riboflavinlösung im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums.

Nach Zugabe von Diphenylamin-Reagens zu den sauren Zell-extrakten wird die gelbe Eigenfarbe deutlich verstärkt, obwohl die Extrakte hierbei 1:3 verdünnt werden. Nach erfolgter Reaktion des Reagenses mit den Desoxyribosederiva-ten sind die Proben grün gefärbt. Wie Messungen während der 18-stündigen Inkubationszeit der Burton-Reaktion gezeigt ha-ben, wird die Intensität der initialen Gelbfärbung in dieser Zeit nicht wesentlich verändert. Die Abb.2 zeigt das Absorp-tionsverhalten der grünegefärbten Proben im Vergleich zu einer ungestörten Reaktion. Einige Proben weisen für den typischen Absorptionsbereich der Diphenylamin-Reaktion von 570-630 nm so-gar negative Werte auf. Hier wird nicht einmal die Extinktion des

Reagensblindwertes erreicht. Ist die störende Gelbfärbung in größeren Konzentrationen vorhanden (vgl. Abb. 2), so werden gegen den Reagensblindwert zwar positive Extinktionswerte bei 578 nm gemessen, diese Werte sind jedoch zur Ermittlung des Gehaltes an Desoxyribosederivaten völlig unbrauchbar.

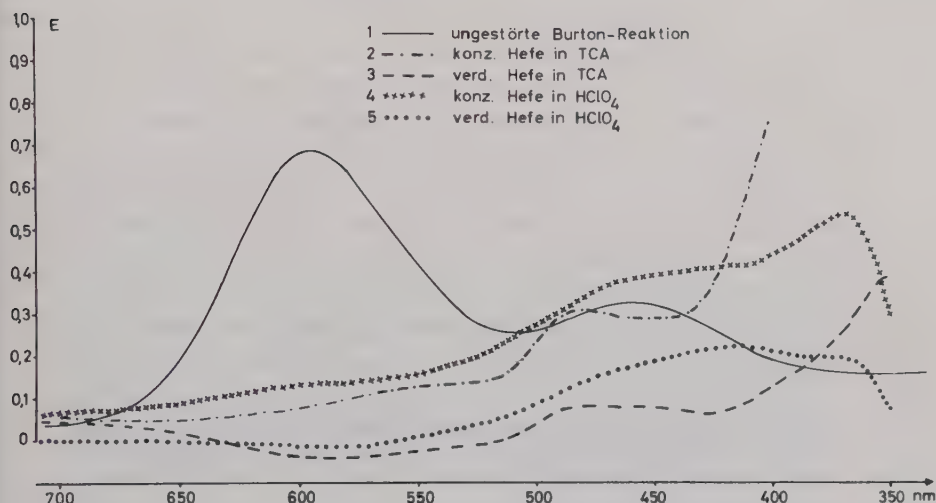


Abb. 2: Die Absorptionsspektren einer Burton-Reaktion im Vergleich zu durch die Gelbfärbung gestörten Reaktionen.

Die grüne Farbe ist nicht durch ein additives Vermischen von Blau und Gelb zu erklären, da in diesem Fall das Absorptionsspektrum der Burton-Reaktion erhalten werden müßte, wenn man die Proben gegen die initiale Gelbfärbung photometriert. Dies gelingt jedoch nicht. Versetzt man gleiche Mengen d-GMP mit verschiedenen stark konzentrierten Hefezelleextrakten, so wird die Extinktion bei 578 nm umso stärker abgeschwächt, je konzentrierter der beigemischte Ex-

trakt ist (vgl. Abb. 3). Dies zeigt deutlich, daß Faktoren vorliegen müssen, die die Ausbildung des blauen Farbstoffes verhindern oder beeinträchtigen.

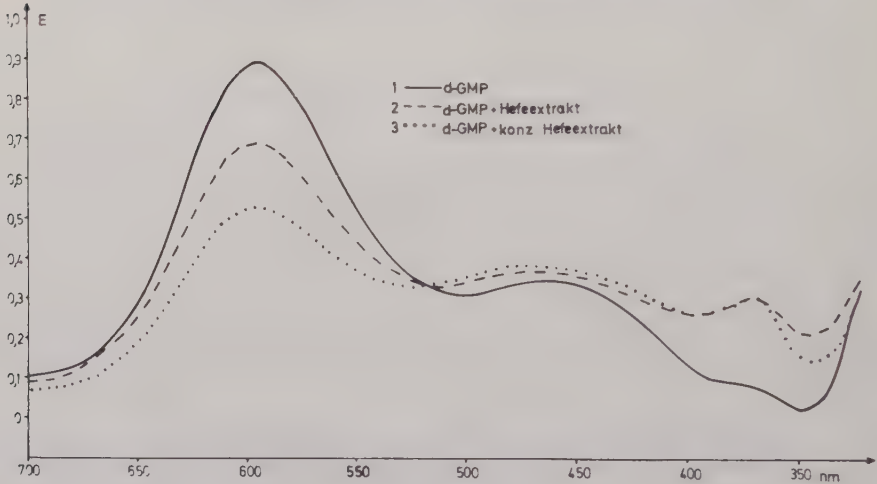


Abb. 3: Der Einfluß von Hefezelleextrakten auf die Farbentwicklung der Burton-Reaktion mit gleichen Mengen an d-GMP.

Die Modifikation der Reaktion nach DISCHE, 1930, für die wir nur 31 % - 37 % der mit der Modifikation nach BURTON, 1956, erzielten Nachweisempfindlichkeit ermittelten, ist in bezug auf die störende Gelbfärbung weit- aus empfindlicher. Die Verwendung von Trichloressigsäure sowie die Verbesserung der Extraktion durch vorheriges Zermahlen der Hefezellen verstärken die Störanfälligkeit der Reaktion deutlich. Ein Vergleich der Ergebnisse von im Minimalmedium nach WILLIAMSON gewachsener Hefe mit unter optimalen Bedingungen nach ECKSTEIN, 1971, inkubierten Zellen zeigt keinen Unterschied hinsichtlich der Gelbfärbung. Auch die drei unter 'Material und Methoden'

angeführten Hefesorten verhielten sich in dieser Hinsicht völlig einheitlich.

Glukoselösungen, Riboflavin- und Folsäurederivate machen ähnliche Verfärbungen der Diphenylamin-Reaktion. Die zum Teil jedoch stark abweichenden Absorptionsspektren zeigen, daß diese Substanzen zumindest nicht allein für die Störung verantwortlich sind.

BURTON, 1955, COHEN, 1944, und OVEREND, 1950 und 1951, beschrieben eine große Anzahl verschiedener Stoffe, die - allerdings erst bei 500-1000fach höherer Konzentration - den Nachweis der Desoxyribose stören können. Hierzu gehören u.a. Cystein, Benztraubensäure, Tannin, Indol, Arabinose, Fruktose und einige andere Zucker. Es ist daher wahrscheinlich, daß es sich bei der beschriebenen Störung um einen Kombinationseffekt mehrerer Extraktbestandteile handelt. Für eine exakte Untersuchung dieses Phänomens kommt erschwerend hinzu, daß die chemische Grundlage der Reaktion von Desoxyribose mit Diphenylamin noch nicht geklärt ist. COHEN, 1944, vermutet, daß es sich um ein passageres Gemisch verschiedener Reaktionsprodukte handelt.

3.2.2. Versuche zur Elimination der störenden Substanzen

Da die Störung der Reaktion von Seiten der dafür verantwortlichen Stoffe und des Mechanismus völlig unübersichtlich ist und auch Konzentrationsveränderungen des Reagenses die Verhältnisse nicht positiv beeinflußt haben, sollte in weiteren Versuchen eine Abtrennung der störenden Faktoren von den Desoxyribosederivaten versucht werden.

a) Die Ausschüttlung der 'initialen' Gelbfärbung mit Chloroform

Es wurde bei Reinigungsarbeiten beobachtet, daß die Gelbfärbung, die sich nach Zugabe des Diphenylamin-Reagens initial entwickelt, mit Chloroform extrahierbar ist. Der Nukleotidgehalt des wässrigen Rückstandes veränderte sich hierdurch nicht. Die wässrige Phase, die noch einen Teil der Essigsäure des Reagenses enthielt, wurde erneut mit Diphenylamin-Reagens versetzt und gegen einen gleich behandelten Reagensblindwert photometriert. Die störende Verfärbung konnte auf diese Weise eliminiert werden. Versuche mit Reinsubstanzen zeigten jedoch, daß mit dieser Modifikation Ausbeuten von nur 35 - 60 % in Relation zur Burton-Reaktion erzielt wurden. Dieser schlecht zu beherrschende Streuungsbereich erschien uns für Routineuntersuchungen zu groß. Die Ursache für diese Fehlerquelle ist in unterschiedlich großen Veränderungen der Reagenskonzentration zu suchen.

b) Versuche zur Abtrennung der Nukleotide durch Präzipitation mit Bariumionen

Folgendes Vorgehen erwies sich nach diversen Vorversuchen als am besten geeignet: 2,50 ml perchlorsaurer Extrakt werden vorsichtig mit Kalilauge gegen Phenolphthalein neutralisiert und das ausgefallene Perchlorat wird abgetrennt. Der Überstand wird mit 0,31 ml einer 20 %igen Bariumacetatlösung und dem fünffachen Volumen Äthanol (96 %) vermischt. Dieser Ansatz bleibt mindestens 12 Stunden bei 2° C stehen, bevor er scharf abzentrifugiert wird. Der Niederschlag wird mit 2,00 ml 0,6 N Perchlorsäure und 0,50 ml 5,0 N Schwefelsäure aufgelöst. Das präzipitierte Bariumsulfat wird abgetrennt und der klare Überstand zur Diphenylamin-Reaktion eingesetzt.

Versuche mit Reinsubstanzen ergaben, daß nach diesem Reinigungsschritt mit Hilfe der Diphenylamin-Reaktion 91 - 96,5 % der Substanzen noch nachzuweisen waren. Die Analyse der sauren Hefezelleextrakte zeigte dagegen, daß zumindest ein Teil der störenden Substanzen zusammen mit den Nukleotiden ausfällt. Wie die Auswertung der Absorptionsspektren ergab, wird die Störung der Farbreaktion gegenüber nicht ausgefällten Proben etwas abgeschwächt. Es sind jedoch die typischen Veränderungen, unter anderem die starke Erniedrigung des Absorptionsmaximums bei 578 nm, nachzuweisen.

c) Adsorption der Nukleotide an Aktivkohle

Die sauren Hefezelleextrakte werden mit je 0,2 g Aktivkohle (Norit A), die zuvor mit 1,0 M Salzsäure und Wasser gut gewaschen wurde, 10 Minuten lang verrührt. Die Kohle wird hierauf scharf abzentrifugiert und noch dreimal mit je 3 ml H₂O gewaschen. Hierbei werden, um ein Schwimmen der Kohle zu vermeiden, jeweils zwei Tropfen Aethanol (90 %) zugesetzt. Der Überstand, der vor allem Zucker, Aminosäuren und andere nicht adsorbierbare Zellbestandteile enthält, wird verworfen. Die 'beladene' Kohle wird dreimal mit je 2 ml eines Gemisches aus gleichen Teilen 96 %igem Aethanol und 4 %iger Ammoniumhydroxydlösung extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden bei 50° C im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird in 2,00 ml 0,6 N Perchlorsäure aufgenommen und auf seinen Gehalt an Desoxyribose-derivaten untersucht.

Diese Reinigungsmethode ist jedoch mit einem großen Analysenfehler behaftet, so daß sie praktisch kaum verwendbar ist.

Eine Variante, bei der die 'beladene' Kohle mit 2,00 ml 0,6 N Trichloressigsäure für 30 Minuten bei 90° C inkubiert wird, liefert weitaus bessere Ergebnisse. Die Kohle wird nach dem Erkalten abgetrennt und die klaren Überstände für die Burton-Reaktion verwendet. Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, verläuft die nach der Kohlebehandlung erstellte Eichkurve wesentlich flacher als die konventionell ermittelte. Es werden aber proportional zur Konzentration an d-GMP ansteigende Extinktionswerte gemessen. Dennoch ist die Methode nur bedingt brauchbar, da feine Unterschiede des Gehaltes an Desoxyribosederivaten nicht erfaßt werden.

Tabelle 1: Die Werte der Eichkurven.

µg d-GMP/ml	E ₅₇₈	E ₅₇₈
	ohne Kohlebeh.	nach Kohlebeh.
7,5	0,12	0,029
15,0	0,26	0,035
22,5	0,37	0,041
30,0	0,46	0,045

3.2.2.1. Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse, die mit dieser Reinigungsmethode bei der Untersuchung aller bei einem Wachstumsversuch geernteten Proben erhalten wurden, sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die Hefezellen waren im Vollmedium nach HILZ et al., 1964, inkubiert. Die Vitamine wurden nach 180 Minuten Wachstum zugesetzt.

Tabelle 2: Das Verhalten von Hefegewicht, der Konzentration von DNS und der diphenylaminpositiven Substanzen in der säurelöslichen Fraktion während eines Vermehrungsversuches.

Probe	Erntezeit (min)	Hefegew. (mg)	säurelös. Fraktion E ₅₇₈	DNS E ₅₇₈
1	10	100	0,012	0,175
2	125	200	0,028	0,180
3	175	208	0,020	0,179
Biotin- zusatz	0			
4	7	230	0,040	0,185
5	24	242	0,020	0,178
6	36	275	0,022	0,189
7	48	281	0,026	0,181
8	60	300	0,047	0,176
9	72	325	0,061	0,214
10	84	340	0,059	0,240
11	96	375	0,032	0,261
12	108	416	0,027	0,290
13	120	443	0,027	0,345
14	132	482	0,032	0,350
15	144	543	0,050	0,376
16	156	580	0,120	0,366
17	168	652	0,112	0,369
18	180	694	0,116	0,378
19	192	720	0,152	0,533
20	204	794	0,200	0,598
21	216	870	0,101	0,688
22	228	1014	0,064	0,721

Die Extinktionswerte der Burton-Reaktion zeigen deutliche Unterschiede. Zu Beginn der DNS-Reduplikation steigt der Gehalt an diphenylamin-positivem Material in der säurelöslichen Fraktion auf etwa dreifach höhere Werte an. Diese Zunahme der Desoxyribosederivate wird nach 20 - 30 Minuten durch die nun stark einsetzende Synthese der DNS wieder aufgefangen. Hier ergibt sich ein wesentlicher Unterschied zu den Ergebnissen von ECKSTEIN, 1971, der eine während der ganzen Interphase kontinuierlich zunehmende Aufstockung der Desoxynukleotidpools fand. Ein derartig umfangreiches Horten der DNS-Bausteine vor der DNS-Reduplikation erscheint allerdings sehr unwahrscheinlich (vgl. DIFFUS, 1971).

Unter Berücksichtigung der von ECKSTEIN, 1971, verwendeten Methodik sind folgende Fehler für das Zustandekommen seiner Ergebnisse wahrscheinlich. Es wurden Trichloressigsäure als Extraktionsmittel und die Dische-Reaktion zur Bestimmung der Desoxyribosederivate eingesetzt. Beide Faktoren verstärkten unter unseren Bedingungen die störende Gelbfärbung.

Für einen Vermehrungszyklus erntete er jeweils gleiche Volumina der Hefesuspension. Die Konzentration der Hefezellen steigt wachstumsbedingt von Probe zu Probe an. Wie aus Abb. 2 ersichtlich ist, misst er unter Umständen lediglich die durch die Gelbfärbung hervorgerufene Absorption der Proben, die mit steigender Hefekonzentration ebenfalls ansteigt. Nach erfolgter DNS-Reduplikation erntete er für den nächsten Zyklus volumenmäßig nur noch die Hälfte, so daß die ersten Werte des neuen Zyklus - bedingt durch eine geringere Störung - kleiner sind als die letzten Extinktionswerte des vorausgegangenen Zyklus. Diese Überlegungen würden die von ihm gefundene,

kontinuierlich ansteigende Konzentrationszunahme der Desoxynukleotide plausibel erklären.

Nach unseren Ergebnissen scheint ein kurzfristiges Ansteigen der Konzentration an Desoxyribosederivaten die DNS-Reduplikation vorzubereiten und überhaupt erst zu ermöglichen. Differenzierte Aussagen lassen sich nach diesen Ergebnissen allerdings nicht machen, da bei der verwendeten Bestimmungsmethode lediglich die Purin-desoxynukleotide erfasst werden. Für weitere Untersuchungen soll daher zunächst versucht werden, Methoden zu finden, die eine Analyse möglichst vieler Nukleotidderivate zulassen.

TEIL B

4. Papierchromatographische Trennungsmöglichkeiten der sauren Zellextrakte.

Die Papierchromatographie ist das älteste und technisch einfachste chromatographische Trennverfahren. Im Jahre 1822 erkannte RUNGE die Fähigkeit von Papierstreifen, Farbstoffgemische in ihre Einzelkomponenten aufzutrennen. Er unternahm diese Trennungen jedoch nicht aus analytischem Interesse, sondern schlechthin aus Freude an den oft kurios gestalteten, farbigen Mustern (vgl. RUNGE, 1855). Diese eher ästhetische Betrachtungsweise der Ergebnisse ist vielleicht der Grund dafür, daß dieses wichtige analytische Verfahren, abgesehen von einigen wenig beachteten Einzelarbeiten von SCHÖNBEIN, 1861, und Fischer et al., 1892, vernachlässigt wurde und völlig in Vergessenheit geriet.

Erst 1944 entdeckten CONSDEN et al. die trennungsanalytischen Eigenschaften von Filtrierpapier aufs Neue. Angeregt durch die Erfolge von MARTIN et al., 1941, mit verteilungschromatographischen Analysen über Silicagel-Säulen versuchten sie, anstelle der Säulen einfach Papierstreifen zu verwenden. Die erfolgversprechenden Trennungen von reinen Aminosäuren veranlassten daraufhin eine große Zahl von Wissenschaftlern, sich bis zum heutigen Tag mit papierchromatographischen Techniken zur Trennung von Aminosäuren, Zuckergemischen, Farbstoffen, Phenolen, Steroiden usw. zu beschäftigen.

Sehr viele Laboratorien verwenden dieses analytische Verfahren auch für Trennungen von Zuckerphosphaten, speziell zur Untersuchung des Stoffwechsels der Nuklein-

säurebausteine (vgl. hierzu: HANES et al., 1949, KUNZ et al., 1958, LANE, 1963, GERLACH et al., 1965, FINK et al., 1966, GEIBEL, 1971, und HENNIG, 1971).

Recht respektable Trennergebnisse erzielte VANDERHEIDEN, 1968, mit seinem Laufmittel I für Nukleotidreinsubstanzen auf Whatman Papier Nr. 1. Wir übernahmen daher die Zusammensetzung des Laufmittelmisches von VANDERHEIDEN und versuchten damit, Reinsubstanzgemische und saure Hefezelleextrakte auf Whatman-Papier ET 31 zu trennen.

Die Reinsubstanzen (je 10 µg) und die neutralisierten Extrakte aus 30 mg Hefe wurden mit Hilfe einer 50 µl Hamilton-Spritze im kalten Luftstrom auf die Startlinie punktförmig aufgetragen. Die Flecke erreichten dabei einen Durchmesser von 0,5 - 0,8 cm. Die Chromatogramme wurden in einem Glaszylinder mit eingeschliffenem Deckel (60 cm Höhe, 28 cm Durchmesser) in 27 h - 30 h aufsteigend entwickelt. Als Vorversuche zur Hochvoltelektrophorese chromatographierten wir an dieser Stelle auch Reinsubstanzgemische mit Elektrophoresepuffer I in 2 h auf- und absteigend.

Die Abb. 4 zeigt je ein Chromatogramm der drei beschriebenen Methoden. Die Entwicklung mit dem Laufmittel nach VANDERHEIDEN liefert eine Gruppentrennung der Reinsubstanzen in Basen, Mono-, Di- und Triphosphate. Es gelingt nicht, durch Verlängerung der Entwicklungszeit besser aufgelöste Chromatogramme zu bekommen. In diesen Fällen wirkt sich die Vergrößerung der Flecke stark nachteilig auf das Trennergebnis aus. Das Chromatogramm des Hefeextraktes ist noch schlechter aufgelöst als das der Reinsubstanzen. Mit dem Elektrophoresepuffer ist papierchromatographisch weder auf-

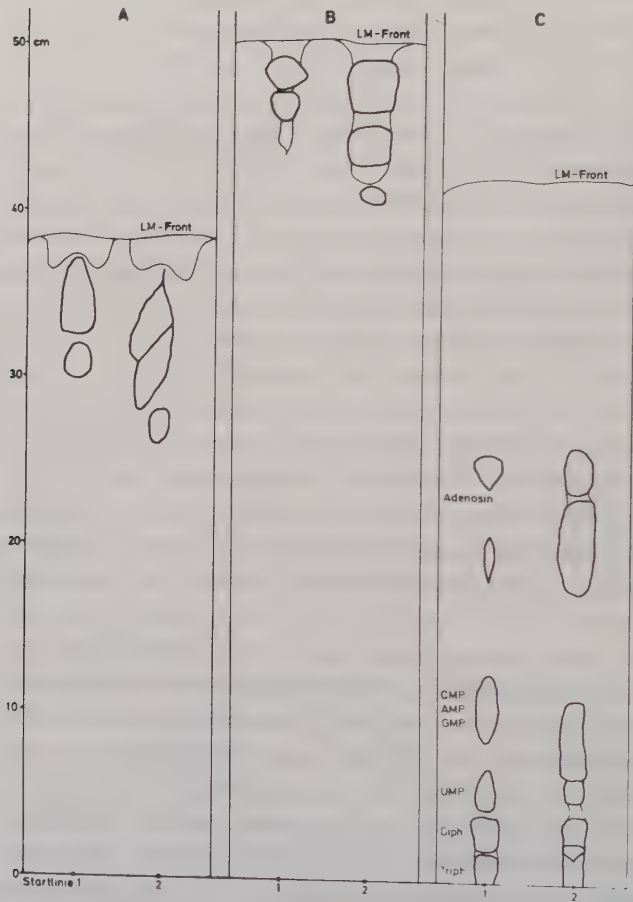


Abb. 4: Papierchromatographische Trennversuche.
Startpunkt 1 = Reinsubstanzgemische,
Startpunkt 2 = Hefeextrakt.
A: Im Elektrophoresepuffer I, aufsteigend
B: Im Elektrophoresepuffer I, absteigend
C: Nach VANDERHEIDEN, 1968.

noch absteigend eine Trennung zu erzielen. Die Substanzen laufen fast einheitlich in der Lösungsmittelfront (s. Abb. 4 A u. B).

Abschließend kann nach einem Gesamtüberblick der zur Verfügung stehenden Literatur gesagt werden, daß die Papierchromatographie für viele qualitative Analysen ein einfaches und brauchbares Verfahren ist. Obwohl es nicht an Versuchen gefehlt hat, diese Untersuchungsmethode auch für quantitative Analysen einzusetzen, muß man erkennen, daß die Grenzen dieses Verfahren - abgesehen von der Analyse radioaktiv markierter Stoffe - hierbei doch wesentlich überschritten werden.

5. Hochvoltelektrophoretische Trennversuche.

Aus der Papierchromatographie mit ihren langen Analysenzeiten und unberechenbaren R_F -Werten entwickelten WIELAND und FISCHER, 1948, die Papier-elektrophorese. Hierbei dient das Papier als Träger für das leitende Lösungsmittel und das zu trennende Substanzgemisch, dessen Einzelkomponenten unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld aufweisen. Durch die bei der Hochvoltelektrophorese (30 - 90 V/cm) stark verkürzten Analysenzeiten wird eine nur geringfügige Vergrößerung der aufgetragenen Flecke verursacht und damit die Trennschärfe verbessert. Durch Vergrößerung des Spannungsgefälles steigt die Wanderungsgeschwindigkeit der polarisierten Teilchen linear an, während dagegen die freiwerdende Joulesche Wärme mit dem Quadrat größer wird. Hieraus ist erklärlich, daß das Hauptproblem der Hochvoltelektrophorese die Ableitung dieser Wärme darstellt.

Die Purin- und Pyrimidinnukleotide wurden sehr häufig mit papierelektrophoretischen Methoden bei niedrigem Spannungsgefälle fraktioniert (vgl. MICHEL, 1958). Für die Trennung der Basen und Nukleotide erzielten REINAUER et al., 1965, in Natriumboratlösung, pH 8,0 bzw. Glycinpuffer, pH 10,0, mit einem Spannungsgefälle von 70 - 90 V/cm gute Trennergebnisse. Es muß allerdings gesagt werden, daß Apparaturen von Standardlaboratorien durch die hierbei anfallende Wärmemenge bei weitem überfordert sind. Diese Wärmeproduktion kann nur durch eine Anlage mit direktem, flüssigen Wärmeaustauscher beherrscht werden.

Für Nukleotidgemische und säurelösliche Zellbestandteile existieren bisher nur sehr wenige praktikable Trennverfahren auf hochvoltelektrophoretischem Sektor. Wir arbeiteten mit modifizierten Methoden nach SILVER et al., 1970, und KLOUWEN, 1962.

5. 1. Experimentelles

a) Versuche mit Puffer I

1. Die Vorbereitung der Papiere und das Auftragen der Substanzen.

Whatman ET 31 Papier wird auf eine Größe von 80 cm • 22,5 cm zugeschnitten und zu einem Zylinder (20 cm Durchmesser) aufgerollt. Dieser Papierzylinder wird in einem geeigneten Gefäß unter starkem Rühren in 1,0 M Salzsäure für 2 Stunden gewaschen. Hierauf wird das Papier mit Wasser abgespült bis das Waschwasser einen pH-Wert von etwa 6,5 aufweist und über Nacht bei Zimmertemperatur getrocknet.

Am folgenden Tag werden je 10 - 15 µg der Reinsubstanzen sowie die neutralisierten Extrakte aus 30 - 50 mg Hefe mit einer 50 µl Hamilton-Spritze im kalten Luftstrom aufgetragen. Die Startlinie ist 22 cm vom linken Rand des Papierstreifens entfernt. Während des Auftragens wird ein etwa 3 mm dicker Plastikstab in Höhe der Startlinie untergelegt, um zu vermeiden, daß die frisch aufgetragenen Lösungen von der Unterlage aufgesaugt werden. Die Startflecke hatten einen Durchmesser von 0,5 - 0,9 cm und einen Abstand von 2,5 - 3,0 cm zueinander. In einem flachen, rechteckigen Glasbecken wird der Papierstreifen nun von beiden Seiten der Startlinie aus so mit Elektrophoresepuffer befeuchtet, daß die zueinander fließenden Pufferfronten genau an der Startlinie aufeinandertreffen. Durch geschicktes Anheben der langsamer laufenden Seite ist dies leicht zu steuern.

Nach vollständiger Befeuchtung wird der Streifen auf einen ausreichend großen Whatman 3 MM Filtrierpapierbogen gelegt. Hierbei ist wieder darauf zu achten, daß die Startlinie nicht mit der Unterlage in Kontakt kommt. Mit einem zweiten Filtrierpapierbogen, der im Bereich der Startlinie einen 3 cm breiten Ausschnitt besitzt, wird der befeuchtete Papierstreifen abgedeckt und mit einer Fotowalze vorsichtig von beiden Seiten in Richtung auf die Startlinie ausgewalzt. Bei zu starkem, einseitigen Trockenwalzen kann die Startlinie bis zu 5 cm in ihrer Lage verschoben werden. Das Papier wird auf diese Weise so lange getrocknet bis der Quotient, Feuchtgewicht dividiert durch Trockengewicht, Werte von 1,8 - 1,9 erreicht hat. Bei diesem Feuchtigkeitsgrad ist die Elektrophorese unter unseren Bedingungen am besten durchzuführen.

2. Durchführung der Elektrophorese.

Zur besseren Isolation wird eine 0,5 cm starke Glasplatte auf den Kühler der Elektrophoreseanlage gelegt. Der vorbereitete Filtrierpapierstreifen wird nun so auf diese vorgekühlte Glasplatte placiert, daß sich die Startlinie in Nähe der Kathode befindet und beide Enden gleich weit in die Puffergefäße eintauchen. Mit einer 1,0 cm starken Glasplatte wird das Papier nun abgedeckt und auf 1° C temperiert.

Nach Anlegen der Ausgangsspannung von 4400 V wird ein Protokoll geführt, das in fünfminütigem Abstand die jeweiligen Werte für die Temperatur der den Kühler verlassenden Flüssigkeit, die Spannung und die Stromstärke festhält (vgl. Tab. 3). Bei einer Temperatur der Kühlflüssigkeit von 10,5° - 11° C und/oder einer Belastung des Chromatogramms von 350 Watt wird die Spannung entsprechend vermindert. Nach Beendigung der gewünschten Analysenzeit werden die Chromatogramme bei Zimmertemperatur getrocknet, unter einer UV - Lampe sichtbar gemacht und mit einem Bleistift sorgfältig markiert.

Um für sämtliche Chromatogramme identische Laufstrecken der einzelnen Stoffe zu erhalten, wurden alle Analysen bis zu einem Endwert von 300 000 V · min gefahren. Für eine überschlagsmäßige Berechnung der notwendigen Analysenzeit - bei von Versuch zu Versuch schwankendem Verlauf der Spannungswerte - wurde folgendermaßen verfahren:

Der Ablauf der Analyse wird in drei Abschnitte eingeteilt (vgl. hierzu Tab. 3). Der erste Abschnitt dauert in unserem Fall 30 min und ist durch konstante Spannungswerte charakterisiert. Der zweite Abschnitt

reicht von der 30. bis zur 50. Minute und zeigt einen konstanten Spannungsabfall. Der dritte Teil des Protokolls weist wieder gleichbleibende Spannungswerte auf. Veränderlich ist allein die Länge der letzten Phase. Die für das gewünschte Spannungs-Zeit-Produkt erforderliche Länge dieses Abschnittes wurde nach folgender Gleichung ermittelt.

$$t_3 = \frac{P - (V_1 \cdot t_1 + V_2 \cdot t_2)}{V_3}$$

Erklärung der Symbole:

- P = gewünschtes Endprodukt (V · min),
V₁ · t₁ = Produkt des Abschnittes I (V · min),
V₂ = Mittelwert der Spannung des Abschnittes II (V),
t₂ = Länge des Abschnittes II (min),
V₃ = konst. Spannungswert des Abschnittes III (V),
t₃ = gefragte Länge des Abschnittes III (min).

Die Anwendung dieser Gleichung ermöglicht reproduzierbare Ergebnisse bei stets optimaler Wärmebelastung in kürzest möglicher Analysenzeit.

b) Versuche mit Puffer II

Diese Versuche wurden in gleicher Weise, wie für den Puffer I beschrieben, durchgeführt. Lediglich vor dem Trocknen der entwickelten Chromatogramme mußte noch ein zusätzlicher Waschgang der Chromatogramme in Essigester eingefügt werden. Hierbei wurde das uv-absorbierende Pyridin entfernt, so daß nach dem Trocknungsvorgang die Flecke der Nukleotide auf weißem Untergrund sichtbar waren. Die Tabellen 3 und 4 zeigen je ein Analysenprotokoll dieser Versuche.

Tabelle 3: Analysenprotokoll einer Elektrophorese im Puffer n. SILVER.

Zeit (min)	Temp. (°C)	Volt (V)	Ampere (mA)	Watt (W)
0	8,6	4400	34	149
5	8,8	4400	42	185
10	9,0	4400	50	220
15	9,2	4400	60	264
20	9,5	4400	78	343
25	10,0	4400	100	440
30	10,5	3600	100	360
35	10,8	3200	100	320
40	10,9	3000	100	300
45	10,9	3000	100	300
50	10,8	2600	110	286
55	10,8	2600	115	299
60	10,9	2600	116	302
65	11,0	2600	108	283
70	10,9	2600	108	283
75	10,9	2600	110	286
80	10,9	2600	110	286
85	--	2600	110	286
90	10,7	2600	112	290
95	10,7	2600	112	290
100	10,7	2600	112	290
105	10,7	2600	114	296

Tabelle 4: Analysenprotokoll einer Elektrophorese im Puffer n. KLOWEN.

Zeit (min)	Temp. (°C)	Volt (V)	Ampere (mA)	Watt (W)
0	8,5	2500	43	108
5	--	2500	--	--
10	--	2500	--	--
15	9,0	2500	58	145
20	9,0	2500	65	163
25	9,0	2500	70	175
30	--	2500	--	--
35	9,3	2500	90	225
40	9,5	2500	96	240
45	9,7	2500	110	275
50	10,0	2500	120	300
55	10,1	2200	120	264
60	10,2	2100	120	252
65	10,2	2000	120	240
70	10,3	2000	130	260
75	10,3	2000	135	270
80	10,5	2000	143	286
85	10,5	2000	150	300

5.2. Ergebnisse und Diskussion.

Die Abbildungen 5 und 6 zeigen Chromatogramme von Reinsubstanzen und sauren Hefezelleextrakten bei Verwendung beider Puffersysteme. In den Legenden zu den Abbildungen sind die unter den beschriebenen Versuchsbedingungen erzielten Laufstrecken und R_f - Quotienten für die verwendeten Reinsubstanzen angegeben. Den R_f - Quotienten für einen Stoff erhält man nach Division seiner Laufstrecke durch die Laufstrecke der am weitesten gelaufenen Substanz.

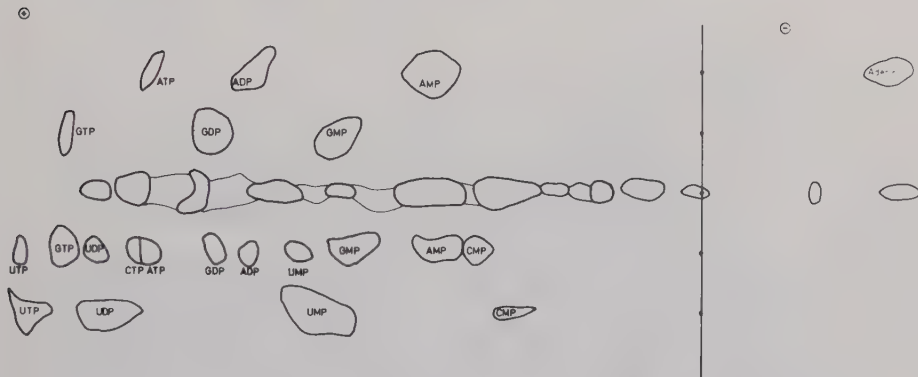


Abb. 5: Hochvolt elektrophoreseschromatogramm im Puffer I. Am mittleren Startpunkt wurde ein Hefeextrakt aufgetragen.

Die Laufstrecken und R_f - Quotienten der Reinsubstanzen:

Reins.	Lstr. (cm)	R_f -Q
UTP	49,0	1,0
GTP	46,9	0,95
UDP	45,5	0,92
CTP	45,0	0,91
ATP	44,0	0,89
GDP	41,5	0,84
ADP	36,0	0,73

Reins.	Lstr. (cm)	R_f -Q
CDP	33,5	0,68
UMP	31,0	0,63
GMP	27,5	0,56
AMP	19,0	0,38
CMP	14,0	0,28
Guanos.	7,0	0,14
Adenin	-13,0	--

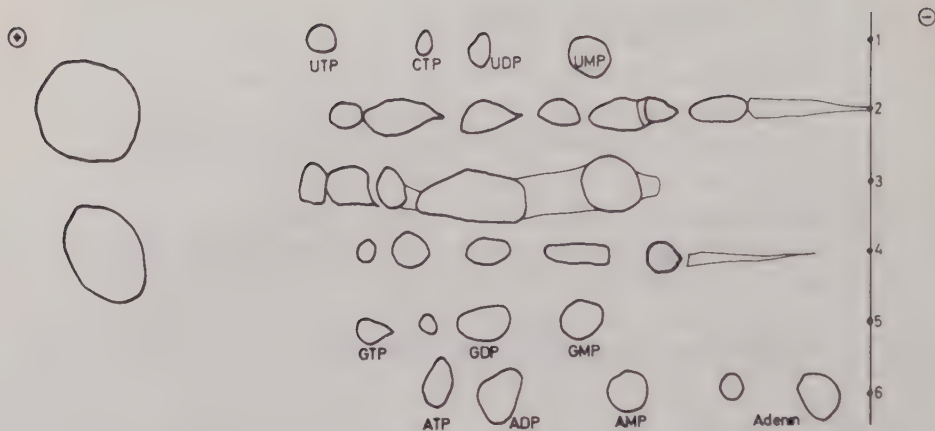


Abb. 6: Hochvoltelektrophoreseschromatogramm im Puffer II.
 Startpunkt 2: Extrakt aus 40 mg Hefe,
 Startpunkt 3: Gemisch aus 14 Reinsubstanzen,
 Startpunkt 4: Extrakt aus 20 mg Hefe.
 Die Laufstrecken und R_f - Quotienten der Reinsubstanzen:

Reins.	Lstr. (cm)	R_f -Q
UTP	21,0	1,0
GTP	12,2	0,91
CTP	18,2	0,68
ATP	16,8	0,80
UDP	16,3	0,77
GDP	16,0	0,76
CDP	15,2	0,72

Reins.	Lstr. (cm)	R_f -Q
ADP	13,5	0,64
UMP	13,0	0,61
GMP	12,0	0,57
AMP	10,0	0,47
CMP	9,8	0,46
Guanos.	7,1	0,33
Adenin	2,3	0,11

Die mit Puffer I entwickelten Chromatogramme weisen für die Reinsubstanzen eine gute Trennung auf. Lediglich die Flecke CMP und AMP sowie GDP, ATP, CTP und UDP liegen dicht beieinander, so daß hier die quantitative Auswertung Schwierigkeiten bereitet.

Für die Hefechromatogramme ist charakteristisch, daß die einzelnen Flecke nicht scharf begrenzt sind, sondern konfluierend ineinander übergehen. Hier ist eine quantitative Analyse nicht durchzuführen. Interessant ist das Auftreten von im UV-Licht fluoreszierenden Flecken. Die außerordentlich große Überlappungstendenz der Hefechromatogramme ist auf zweierlei Ursachen zurückzuführen. Es dürften hierfür einmal die quantitativ unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Stoffe und zum anderen die qualitativ außerordentlich komplexe Zusammensetzung der Extrakte verantwortlich sein.

Die Laufstrecken der mit Puffer II entwickelten Chromatogramme sind wesentlich kürzer als die mit Puffer I ermittelten Werte. Diese Verkürzung der Laufstrecken ist dafür verantwortlich, daß die Trennergebnisse mit dem Puffer II - besonders im Di- und Triphosphatbereich - für die Reinsubstanzgemische deutlich schlechter sind. Es werden im Puffer II zwar etwas schärfer begrenzte und kleinere Flecke entwickelt, dennoch ist die Überlappungstendenz der Hefechromatogramme ebenso groß wie für den Puffer I. Die weiter als alle aufgetragenen Reinsubstanzen laufenden, dicken Flecke der Hefechromatogramme (vgl. Abb. 6) sind mit dem unten beschriebenen Peak 19 der Säulenchromatographie identisch.

Abschließend kann festgestellt werden, daß die beschriebenen hochvoltelektrophoretischen Methoden - besonders unter Berücksichtigung der gut standardisierbaren Laufstrecken - für die Trennung und quantitative Bestimmung von Reinsubstanzgemischen und weniger komplex zusammengesetzten Hydrolysaten der Nukleinsäuren recht gut geeignet sind. Die komplexe Zusammensetzung der sauren Hefezellextrakte überfordert die Möglichkeiten dieser Methode jedoch bei weitem.

6. Übersicht über dünnschicht- und säulenchromatographische Trennverfahren.

Die Dünnschichtchromatographie wurde entwickelt, um die Vorteile der Papierchromatographie mit den Vorteilen der Säulenchromatographie, die vor allem auf dem großen Angebot mannigfaltiger Gerüstsubstanzen mit verschiedenartigen Trennprinzipien beruhen, zu vereinigen. Durch den Einsatz geeigneter Bindemittel ist es heute möglich, beinahe jede chromatographisch verwendbare Matrix als dünne, haftende Schicht auf Glas-, Aluminium- oder Kunststoffplatten aufzuziehen. Die Trennungen auf diesen Platten benötigen geringere Laufzeiten als entsprechende papierchromatographische Analysen. Die Flecke bleiben dadurch relativ klein und die Auflösung wird wesentlich verbessert.

Mit hervorragenden Fortschritten und Erfolgen bezüglich der Schwierigkeiten bei der Auftrennung von Nukleotid- und Coenzymgemischen nahm die Dünnschichtchromatographie zwischen 1960 und 1965 - bedingt durch den Einsatz von Ionenaustauschern - einen unerwarteten Aufschwung. Der folgende Abschnitt soll einen kurzen Überblick über diese Trennverfahren vermitteln.

RANDERATH setzte für die ersten Versuche mit Ecteola-Zellulose (1961) und DEAE-Zellulose (1962) beschichtete Platten ein. Doch schon kurz darauf stellte er fest (1962), daß PEI-Zellulose sich besser zu Trennungen von Nukleotidderivaten eignet. Sein Hinweis (1963) auf die gute Trennung von 12 Nukleotiden auf mit Polyäthylenimin getränktem Whatman-Papier wurde wegen der erwähnten Vorteile der Dünnschichtchromatographie über die Papierchromatographie nur wenig beachtet. REYES, 1972, setzte dagegen die PEI-Zelluloseplatten lediglich zur Trennung der Nukleotide von ihren entsprechenden Basen und Nukleosiden ein.

Grundlegende Arbeiten auf diesem Gebiet veröffentlichte PATAKI, 1967. Ihm gelang es, durch zweidimensionale Entwicklung der Platten in verschiedenen Puffern über 60 Nukleoderivate voneinander zu trennen. Mit ähnlichen Methoden untersuchten JONES et al., 1972, und LUST et al., 1972, die Nukleotidzusammensetzung von Herzmuskel- und Lebergewebe.

Durch solche Ergebnisse ermutigt entschlossen wir uns, die PEI-Zellulose, trotz der negativen Beurteilung von RUSTUM et al., 1973, für die Säulenchromatographie zu verwenden. Diese Variante weist für unsere Fragestellung gegenüber der Dünnschichtchromatographie folgende Vorteile auf.

1. Auf Dünnschichtplatten lassen sich nur geringe Mengen von Lösungen auftragen. Bei dem Einsatz von stark eingeeengten sauren Extrakten sind unter Umständen nicht alle Bestandteile quantitativ gelöst.
2. Unbekannte Flecke können aus Mangel an Material nur sehr schwer identifiziert werden.
3. Die quantitative Auswertung ist bei nicht radioaktiv markierten Stoffen mit größeren Fehlern behaftet.
4. Bei ungleichmäßig zusammengesetzten Zellextrakten werden die Platten sehr leicht überladen, so daß keine guten Trennergebnisse zustandekommen. (vgl. oben und LUST et al., 1972).

Auf dem Sektor der Säulenchromatographie sind bisher eine große Anzahl von mehr oder weniger brauchbaren Trennungen dieser Stoffklasse beschrieben. Den Grundstein zur Analyse der Nukleotidderivate mit Ionenaustauschersäulen legte COHN im Jahre 1950.

HURLBERT et al., gelang es 1954, Organextrakte nach einem aufwendigen Verfahren über Dowex 1 x 10 in eine große Zahl mehr oder weniger gut voneinander getrennter Fraktionen zu zerlegen. Durch Veränderung der Eluationspuffer und die Verwendung verschiedener Gradienten wurde mehrfach versucht, die Methode zu verbessern und zu vereinfachen.

LERNER et al., 1960, eluierten eine Dowex 1 x 8 - Säule mit mehreren verschiedenen steilen Gradienten. Sie benötigten insgesamt über zwei Liter Eluationsflüssigkeit. DAVIDECK et al., setzten 1971 zur Auftrennung von sauren Fleischextrakten das gleiche Harz in einer "Dreistufensäule" ein und eluierten in 48 Stunden mit fünf verschiedenen Puffersystemen (vgl. hierzu auch PANKOTSCH, 1969, und HEIMSOTH, 1960).

Eine andere Eluationsmöglichkeit dieses Harzes beschrieben COHN et al., 1961. Sie setzten den flüchtigen Ammoniumbikarbonatpuffer ein und konnten so die fraktionierten Stoffe leicht wieder entsalzen. Weniger gute Ergebnisse erzielten DOUGHERTY et al., 1969, beim Entsalzen über Poly-N-vinylpyrrolidon. Zur Auftrennung von komplexen Gemischen scheint dieses Material, wie aus einer Mitteilung von LERNER et al., 1968, hervorgeht, ebenfalls nicht geeignet zu sein.

Andere Autoren (CARISANO et al., 1969) hydrolysieren die Phosphatester unter drastischen Bedingungen und bestimmen nach Trennung des Hydrolysates über den Kationenaustauscher, Aminex A 5, lediglich das Verhältnis der Basen zueinander. BLATTNER et al., 1967, berichten über gute Trennergebnisse von Monophosphatderivaten auf dem Kationenaustauscher, Dowex 50 W x 4.

Die schärfsten Trennungen wurden bisher auf DEAE-Sephadex- und DEAE - Zellulosesäulen von CALDWELL, 1969, und RUSTUM et al., 1973, für säurelösliche Zellextrakte beschrieben. Auch DROBISHEV et al., 1972, berichten über respektable Ergebnisse in knapp 7 Stunden über Dowex 1 x 8 mit Hilfe eines Flüssigkeitschromatographen. Die Analysen von BROWN, 1970, und 1971, mit einem apparativ sehr aufwendigen Hochdruckchromatographen zeichnen sich zwar durch eine ausgesprochen niedrige Nachweisgrenze aus, die einzelnen Fraktionen werden jedoch nur unzureichend voneinander abgetrennt.

Die von CHRISTIANSON et al., 1968, mit PEI-Avicel beschriebenen Trennergebnisse sind der Methode von CALDWELL, 1969, mit DEAE-Sephadex gleichwertig, obwohl RUSTUM et al., 1973, die PEI-Zellulose mit DEAE-Zellulose verglichen haben, anmerken, daß sich mit DEAE-Zellulose bessere und reproduzierbarere Trennungen erzielen lassen.

7. Versuche zur Trennung von Nukleotidgemischen und sauren Hefezellextrakten über PEI-Zellulosesäulen.

Die lange Liste der aufgeführten säulenchromatographischen Methoden umfasst nur einen Teil der auf diesem Gebiet veröffentlichten Arbeiten. Es sind allerdings die besten und praktikabelsten der uns bekannten Analyseverfahren. Dennoch weisen alle für Routineuntersuchungen zum Teil gravierende Nachteile auf.

Einige Verfahren benötigen vier bis fünf verschiedene Eluationsgradienten (vgl. Lit. 21, 33, 66) und damit die ständige Anwesenheit einer Aufsichtsperson während

des Trennvorganges. Es wurden Eluationsvolumina von 1300 ml - 3000 ml und 30 - 60 Stunden für eine Analyse benötigt (vgl. Lit. 21, 26, 29, 33, 56, 66 und 86). Die Nachweisgrenze für die einzelnen Nukleotide liegt wegen der starken Verdünnung der Eluate bei 3 mg - 10 mg Trockensubstanz. Durch den Einsatz von sauren und auch alkalischen Eluationspuffern muß mit hydrolytischen Veränderungen während des langen Trennvorganges gerechnet werden. Allein die flüssigkeitschromatographischen Verfahren (vgl. Lit. 16, 17 und 40) erzielen unter hohem Druck mit großem finanziellen und apparativen Aufwand kurze Analysenzeiten und hohe Nachweisempfindlichkeit.

Hiervon abgesehen liefert die DEAE-Zellulosesäule von RUSTUM et al., die in 25 h Leberzellextrakte mit 450 ml eines sauren (pH 4,4) Puffers trennt, bei weitem die besten Ergebnisse. Im folgenden Text wird eine von uns entwickelte, allen beschriebenen Verfahren überlegene Methode mit PEI-Zellulosesäulen vorgestellt.

7.1. Kapazitätsbestimmung der PEI-Zellulose.

Der Begriff Ionenaustauschchromatographie beinhaltet nicht allein den Austausch von elektrisch geladenen Teilchen, sondern bezieht sich auch auf andere Trenneigenschaften, die der Ionenaustauscher zusammen mit seiner Matrix besitzt. Hier sind eine große Zahl chemischer und physikalischer Mechanismen, wie z.B. physikalische Adsorption, Wechselwirkungen von stationären und mobilen Ionen, Säure-Basen-Gleichgewichte, Komplexbildung usw. von entscheidender Gewichtigkeit. Für einen umfassenden Überblick (vgl. HELFERICH, 1965).

Da man aus diesen Gründen keine stöchiometrischen Berechnungen über die Kapazität des Austauschers anstellen kann, ist es unumgänglich, eine Kapazitätsbestimmung unter den gegebenen Analysenbedingungen durchzuführen.

Hierzu werden etwa 0,5 g - 1,0 g PEI-Zellulose unter den im folgenden Kapitel beschriebenen Bedingungen vorbehandelt und mit Wasser gewaschen. Anschließend wird das Säulenmaterial mit 25 ml einer ATP-Lösung (mg/ml) gut vermischt. Die Zellulose wird nun abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Hierauf setzt man dem Rückstand 20,0 ml einer 4,0 M Kochsalzlösung zu, verrührt gut und zentrifugiert wieder scharf ab. Im Überstand bestimmt man bei einer Schichtdicke von $d = 1$ cm die Extinktion bei 259 nm gegen eine Kochsalzlösung. Der Zelluloserückstand wird mit Wasser mehrmals sorgfältig gewaschen und nach dem Trocknen ausgewogen. Aus dem Mittelwert von vier Bestimmungen wurde die Kapazität berechnet.

Der Berechnung wurde der molare Extinktionskoeffizient für ATP-Dinatriumsalz, $E_{259 \text{ nm}} = 15,4 \cdot 10^3$ bei pH 7,0, zugrunde gelegt. Dieser Wert wurde dem Werk, Specifications and Criteria for Biochemical Compounds, Second Edition, National Academy of Sciences, National Researchs Council, Washington 1967, entnommen.

Ein Gramm PEI-Zellulose bindet 310,5 Extinktionseinheiten entsprechend 201 mmol ATP-Dinatriumsalz.

7.2. Vorbereitung des Anionenaustauschers und der Säulen.

a) Vorbereitung der PEI-Zellulose.

50 g des handelsüblichen Säulenmaterials werden in 200 ml 1,0 M Kochsalzlösung suspendiert und gut vermischt. Hierauf bleibt die Suspension ruhig stehen, bis der größte Teil der PEI-Zellulose sedimentiert ist. Der leicht gelb gefärbte Überstand, der noch feinere Zellulosepartikel enthält, wird vorsichtig abgehebert und der Rückstand noch viermal in gleicher Weise behandelt.

Man setzt nun 100 ml 1,0 M NaCl-Lösung zu und evakuiert das Gemisch unter kräftigem Rühren mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe, bis keine Gasbläschen mehr entweichen. Hierauf kann die Suspension zum Füllen der Säulen verwendet werden. Der Ionenaustauscher wurde in dieser Form, gut verschlossen, bis zu vier Wochen im Dunklen aufbewahrt, ohne daß eine Beeinträchtigung der Trenneigenschaften festgestellt werden konnte.

b) Vorbereitung der Säulen.

Die Säulen (die genauen Maße siehe unten) bestehen aus einem zylindrischen Glasrohr, das sich an beiden Seiten konisch verjüngt. Diese konischen Abschnitte haben eine Länge von 1,5 cm. Der untere Konus, der Auslauf der Säule, verjüngt sich bis auf einen inneren Durchmesser von etwa 1 mm und besitzt einen 2 cm langen Ansatz als Stutzen für den ableitenden Schlauch. Der obere Konus verjüngt sich lediglich auf zwei Drittel des inneren Durchmessers im zylindrischen Teil. Ihm ist ein Normschliff NS 14,5/23 aufgesetzt.

Mit diesem Normschliff wird ein Trichter mit einem 30 cm langen Auslauf verbunden. Der Auslauf der Säule wird mit einer Schlauchklemme verschlossen und die Säule bis zum oberen Konus mit im Wasserstrahlvakuum entgaster 1,0 M Kochsalzlösung gefüllt. Nun presst man mit einem Glasstab einen etwa erbsgroßen Pfropf feuchter Glaswolle in den unteren Konus und gießt die vorbereitete PEI-Zellulosesuspension in geringem Überschuß in den Trichter. Man läßt das Material 2 - 3 Stunden sedimentieren. Nach dieser Zeit wird der Auslauf der Säule geöffnet und bei einem hydrostatischen Druck von 35 cm Wassersäule mindestens 4 Stunden abtropfen lassen.

Nachdem sich der Ionenaustauscher in dieser Weise abgesetzt hat, hebert man das überschüssige Säulenmaterial und die 1,0 M Kochsalzlösung bis zum oberen Rand der Säule ab und füllt den Trichter, nach sorgfältiger Reinigung, mit Wasser wieder auf. Man läßt nun wieder mindestens vier Stunden unter hydrostatischem Druck abtropfen. Hierauf ist die Säule gebrauchsfertig.

c) Die Eluation der Säule.

Von den für die Chromatographie verwendeten Reinstoffen werden je 50 µg - 100 µg in wässriger Lösung (mg/ml) mit Hilfe einer 50 µl Hamilton-Spritze auf die Säule gegeben. Von den Hefezell-extrakten werden die neutralisierten und gefriergetrockneten Perchlorsäureextrakte aus 150 mg - 250 mg Hefe in 3 ml Wasser gelöst aufgetragen. Ein konstanter Flow wird durch eine Bühler-Mikropumpe garantiert. Das Eluat wird über einen Silikon-schlauch mit einem Lumen von 0,8 mm durch die

Küvette der jeweiligen Überwachungsanlage (s. Material und Methoden) zu einem Fraktionssammler geleitet. Die Gesamtlänge der ableitenden Schläuche beträgt maximal 1,5 Meter. Das entspricht einem Volumen von 3 cm^3 .

7.3. Trennungen über die Säule A.

Die für diese Trennversuche eingesetzte Säule A hat einen inneren Durchmesser von $d = 2,4 \text{ cm}$ und eine Länge des zylindrischen Teils von $l = 15,5 \text{ cm}$. Über diese Säule, die mit einem Bettvolumen von $V = 70 \text{ cm}^3$ etwa 33 g trockene PEI-Zellulose für eine Füllung benötigt, werden Trennungen von Reinsubstanzgemischen mit Hilfe von ein bis zwei linearen Kochsalzkonzentrationsgradienten durchgeführt. Der jeweils verwendete Gradient wird in einem Gradientenmischer, bestehend aus zwei kommunizierenden, zylindrischen Gefäßen ($d = 5 \text{ cm}$, $h = 25 \text{ cm}$), durch Mischen von Lösungen unterschiedlicher Konzentration aufgebaut. Das mit dem Auslauf versehene, vordere Mischgefäß wird mit der weniger konzentrierten, das hintere Vorratsgefäß wird mit der höher konzentrierten Lösung gefüllt.

7.3.1. Ergebnisse mit der Säule A.

Aus 27 Versuchen mit verschiedenen Gradientensystemen und Durchflußgeschwindigkeiten kristallisierten sich für diese Säule drei Methoden heraus, die für Routineuntersuchungen mit entsprechenden Fragestellungen gut geeignet sind. Die einzelnen Elutionspeaks wurden an Hand ihrer UV-Spektren den aufgetragenen Reinsubstanzen zugeordnet. Die angegebenen Molaritäten beziehen sich auf die Kochsalzkonzentration zu Beginn und bei Abbruch des jeweiligen Gradienten.

a) Mit dem Gradient:

0,8 M - 1,0 M, Steigung: 0,05 M/h, Zeit: 3 h

lassen sich bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 100 ml/h die Mono- und Diphosphate - unvollständig voneinander getrennt - in einer Stunde von den Triphosphaten abtrennen. Die vier Triphosphate erscheinen dann innerhalb der nächsten zwei Stunden vollständig voneinander abgetrennt. Die Abb. 7 zeigt das Überwachungschromatogramm einer solchen Analyse.

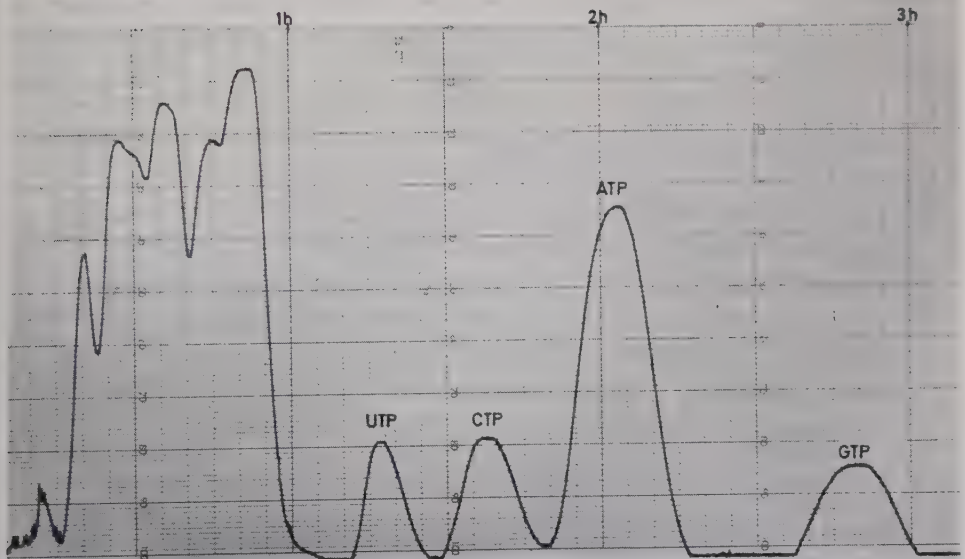


Abb. 7: Eine Triphosphattrennung auf Säule A.

b) Eine komplette Trennung von 8 Di- und Triphosphaten gelingt bei unvollständiger Monophosphattrennung mit einem Flow von 100 ml/h in sieben Stunden mit folgendem Gradienten:

0,2 M - 1,6 M, Steigung: 0,2 M/h, Zeit: 7 h.

c) Mit einem Flow von 50 ml/h können mit stark vergrößerter Nachweisempfindlichkeit 12 Nukleotide der Mono-, Di- und Triphosphatgruppe vollständig fraktioniert werden. Hierzu sind zwei verschieden steile Gradienten und eine Analysenzeit von zehn Stunden notwendig.

1. Gradient: 0,1 M - 0,42 M, Steigerung: 0,08 M/h,
Zeit: 4 h

2. Gradient: 0,65 M - 2,1 M, Steigerung: 0,24 M/h,
Zeit: 6 h

Nach vier Stunden wird der erste Gradient abgebrochen und der zweite für weitere sechs Stunden angeschlossen.

7.4. Trennung über die Säule B

Die Säule B hat einen inneren Durchmesser von $d = 0,9$ cm und eine Länge des zylindrischen Teils von $l = 25$ cm. Sie benötigt für eine Füllung etwa 7 g PEI-Zellulose (Trockengewicht). Durch die veränderten Maße sollte gegenüber der Säule A eine bessere Trennschärfe und eine größere Nachweisempfindlichkeit erreicht werden. Aus diesem Grunde wurde auch versucht, den Flow möglichst klein zu halten.

7.4.1. Trennungen mit 3 Gradienten unterschiedlicher Steigung

Schon bei Vorversuchen mit dieser Säule zeigte sich, daß die für die Säule A entwickelten Gradienten hier völlig ungeeignet sind. Sie steigen vor allem für die Trennung der Di- und Triphosphate zu flach an. Hierdurch werden sehr lange Analysenzeiten erforderlich. Aus diesem Grunde entwickelten wir für diese Säule ein Elutionsverfahren, das sich aus drei Gradienten mit unterschiedlicher Steigung zusammensetzt.

Mit folgenden drei Gradienten werden bei einem Flow von 34 ml/h in elf Stunden scharfe und reproduzierbare Trennungen von 14 Nukleotiden erzielt:

1. Gradient: 0,05 M - 0,25 M, Steigung, 0,045 M/h,
Zeit: 4,5 h
2. Gradient: 0,5 M - 0,885 M, Steigung, 0,11 M/h,
Zeit: 3,5 h
3. Gradient: 1,0 M - 1,6 M, Steigung: 0,2 M/h,
Zeit: 3 h

7.4.2. Trennungen mit konkaven Gradienten

Das Verfahren mit drei Gradienten hat den Nachteil, daß man während der Analyse zum Wechsel der Gradienten anwesend sein muß. Da die Steilheit der einzelnen Gradienten im Verlauf der Analyse ständig vergrößert werden muß (s.o.), versuchten wir günstige, konkav ansteigende Gradienten zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurde ein anderes Gradientenmischsystem eingesetzt. Ein Glaszylinder ($d = 5$ cm, $h = 25$ cm) mit einem Auslauf dient als Mischgefäß und wird mit Wasser gefüllt. Die Auslaufgeschwindigkeit und damit auch die Durchflußgeschwindigkeit der Säule wird durch eine Bühler-Mikropumpe konstant gehalten. Mit Hilfe einer zweiten Mikropumpe wird eine Kochsalzlösung mit geringerem Flow als die Auslaufgeschwindigkeit des Mischgefäßes in dieses Gefäß hineingepumpt. Die Konzentration der die Säule eluierenden Flüssigkeit ändert sich nach folgender e-Funktion in Abhängigkeit von der Zeit. Die Gleichung wurde mit der freundlichen Hilfe der Herren G. Albricht und F.J. Thomé, Mitarbeiter des Instituts für Medizinisch-biologische Statistik und Dokumentation der Philipps-Universität Marburg, abgeleitet.

$$K_a = K_z \cdot \left(1 - e^{-\frac{Z \cdot \ln 1 - \frac{t \cdot (A-Z)}{M_0}}{A - Z}} \right)$$

Erläuterung der Symbole:

- t (min) = Zeit
 A (ml·min⁻¹) = Ablaufgeschwindigkeit aus dem Mischgefäß
 Z (ml·min⁻¹) = Zulaufgeschwindigkeit in das Mischgefäß
 M_0 (ml) = Menge der Flüssigkeit im Mischgefäß zum Zeitpunkt $t = 0$
 K_z (mol·l⁻¹) = Molarität der zulaufenden Flüssigkeit
 K_a (mol·l⁻¹) = Molarität der Flüssigkeit im Mischgefäß zum Zeitpunkt t .

Die Gleichung gilt nur unter der Voraussetzung, daß im Mischgefäß reines Wasser vorgelegt wird.

4.2.1. Ergebnisse verschiedener konkaver Gradienten

Zu dem Aufbau der einzelnen konkaven Gradienten wurden folgende Größen verändert: Das Ausgangsvolumen im Mischgefäß, M_0 , die Zulauf- und Ablaufgeschwindigkeit, Z und A , und die Konzentration der zulaufenden Lösung, K_z .

Die Molarität im Mischgefäß, K_a , wurde je nach Länge des Gradienten für 1300 - 2085 Werte von t unter Zuhilfenahme eines Digitalrechners nach obenstehender Gleichung errechnet und von einem Aristo-Plotter graphisch dargestellt. Für die Zeitachse wurde dabei der gleiche Maßstab gewählt, der auch am LKB-Schreiber für die Registrierung der Überwachungschromatogramme eingestellt war. Die Chromatogramme und die Gradientenprofile können daher - unter Berücksichtigung des Volumens in dem Schlauchsystem von Mischgefäß bis zur Küvette - direkt übereinandergelegt werden. Die Gradientenprofile wurden freundlicherweise von Herrn G. Albricht erstellt. Die Abb. 8 zeigt die Kurven von vier

verschiedenen Gradienten und die Lokalisation der Spitze des ATP-Peaks unter den jeweiligen Bedingungen. Die Gradienten Nr. 1, 2 und 3 weisen ein konstantes Verhältnis von A zu Z auf, verändert wurden hier die Größen M_0 und K_z . Drei weitere Gradienten mit konstanter Konzentration der zulaufenden Flüssigkeit K_z sind in Abbildung 9 dargestellt.

Der Gradient Nr. 4, der Standardgradient für die Analyse von sauren Hefezelleextrakten, ist in beiden Abbildungen enthalten.

Die unterschiedliche Lokalisation der Spitze der ATP-Peaks zeigt, daß die Substanz mit verschiedenem Gradientenverlauf sowohl bei abweichender Kochsalzkonzentration als auch nach unterschiedlich langer Zeit den Ionenaustauscher wieder verläßt. Die Eluation der einzelnen Ionen scheint abhängig zu sein, einmal von der Steigung am Anfang des Gradienten (vgl. Gradient Nr. 4 und Nr. 2 mit Nr. 3) und zum anderen vom Zeitpunkt des steilen Konzentrationsanstieges gegen Ende des Gradienten. Bei zu plötzlichem und frühem 'Abbiegen' kann die Zeit und das Flüssigkeitsreservoir nicht ausreichen, um die Säule vollständig zu eluieren (vgl. Gradient Nr. 1 mit Nr. 2).

Besonders deutlich macht sich dieser Effekt für den Hefepic Nr. 19 bemerkbar. Alle Trennungen von Hefeextrakten mit dem Gradienten Nr. 3 und dem oben beschriebenen Dreistufengradienten zeigten nach dem GTP-Peak nur eine langsam ansteigende Absorptionszunahme des Eluates, die zunächst nicht als Peak gedeutet wurde. Bei Trennungen mit dem Gradienten Nr. 4 wird diese Fraktion so konzentriert eluiert, daß ein deutlicher, dreigipfliger Peak geschrieben wird (s.u.).

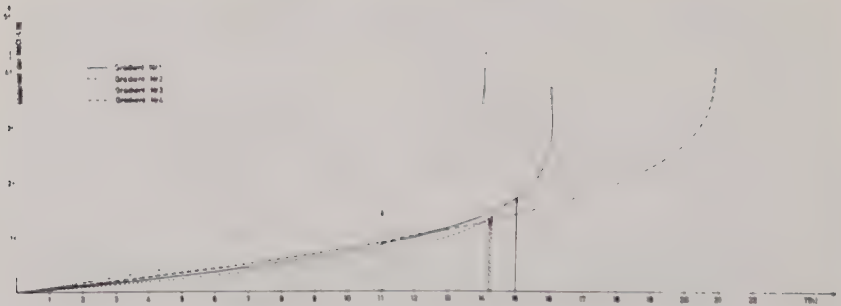


Abb. 8: Profile der Gradienten 1, 2, 3 und 4 mit der Lokalisation der Spitze des ATP-Peaks (Pfeil).

Gradient	A (ml · h ⁻¹)	Z (m · h ⁻¹)	M _a (ml)	K _Z (mol · l ⁻¹)
1	19,8	3,7	260	3,7
2	20,4	3,8	251	2,85
3	20,0	4,2	224	4,55
4	16,0	4,0	250	4,15



Abb. 9: Die Profile der Gradienten 4, 7 und 8

Gradient	A (ml · h ⁻¹)	Z (ml · h ⁻¹)	M _O (ml)	K _Z (mol · l ⁻¹)
4	16,0	4,0	250	4,15
7	20,0	3,5	230	4,15
8	16,0	3,8	210	4,15

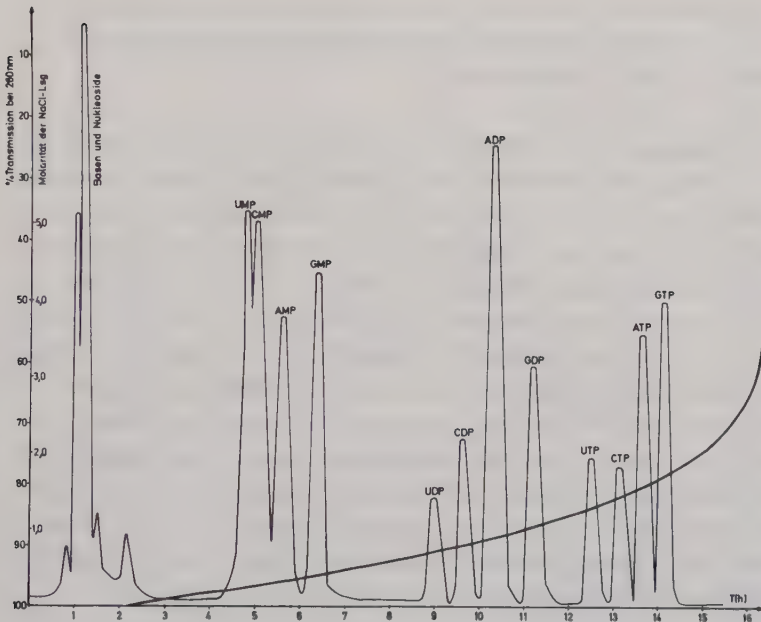


Abb. 10: Trennung von Reinsubstanzen mit Gradient Nr. 3 auf der Säule B.

Die Abbildung 10 illustriert die Trennung eines Reinsubstanzgemisches mit dem Gradienten Nr. 3. In zwölf Stunden wird eine vollständige Fraktionierung erzielt. Für die Analyse von sauren Zellextrakten eignen sich diese Bedingungen allerdings weniger, da die einzelnen Substanzen sehr dicht nacheinander eluiert werden. Für die komplexer zusammengesetzten Zellextrakte bleibt so nur wenig Platz für zusätzliche Peaks. Dies gilt vor allem für den Bereich der Monophosphate. Durch eine Verschiebung des Flowverhältnisses der beiden Pumpen von 1 : 4,5 nach 1 : 5,0 kann für Sonderprobleme der Eluationsbereich der Monophosphate wesentlich verbreitert werden. Entstehen hierbei breitere

Einzelpeaks, so ist dies durch eine geringfügige Verminderung der im Mischgefäß vorgelegten Menge an Wasser (M_0) leicht wieder auszugleichen.

Für Trennungen von Hefezelleextrakten hat sich der Gradient Nr. 4 am besten bewährt. Bis zu der Eluation des GTP-Peaks werden etwa 15,5 Stunden benötigt. Wird auch der Peak 19 abgetrennt, so sind ungefähr 20 Stunden erforderlich. Die Abbildung 11 zeigt das Eluationsprofil eines typischen Hefechromatogramms zusammen mit dem Verlauf des Gradienten Nr. 4 und dem pH-Wert des Eluates. Die Trennung zeichnet sich durch außerordentlich scharfe Peaks, eine sehr konstante Basislinie und annähernd neutrale pH-Werte (pH 6,5 bis 7,0) aus. Der zweimalige Abfall des pH-Wertes zu Beginn der Trennung auf Werte bis zu pH = 4,0 ist auf Hydrolysereaktionen der eluierten Substanzen in der ungepufferten Lösung zurückzuführen. Es handelt sich um Aminosäuren, UTP-Glukuronsäure und Folsäure (s. Tab. 6).

7.5. Die Identifikation der Peaks von Hefechromatogrammen und die Lokalisation wichtiger Reinsubstanzen im Eluationsprofil

Für die Entwicklung der einzelnen Gradientensysteme wurden fast ausschließlich Reinsubstanzen verwendet. Die eluierten Fraktionen wurden in kleinen Portionen aufgefangen und an Hand ihrer Absorptionsspektren zwischen 200 und 300 nm identifiziert. Diese Untersuchungen gaben Aufschluß über die relativen Retentionszeiten der Nukleotidderivate.

Zur Identifikation der Peaks von Hefechromatogrammen wurden sowohl die Erfahrungen von Reinsubstanztrennungen als auch die UV-Spektren der Eluate, geschrieben bei den pH-Werten 7,0, 2,0 und 12,0, herangezogen. Die Trennungen von mit

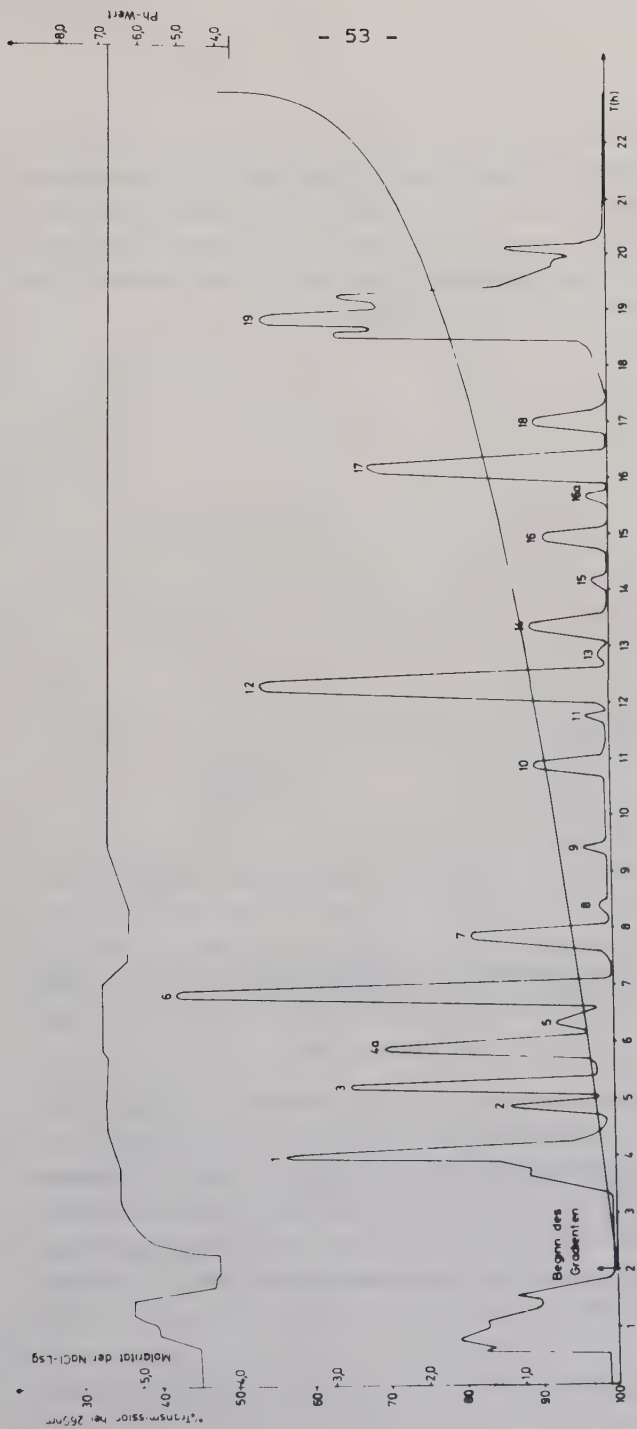


Abb. 11: Die Trennung eines sauren Hefezell-extraktes mit dem Profil des eluierenden Gradienten Nr. 4 auf der Säule B und dem Verlauf des pH-Wertes im Eluat.

^3H -Uracil markierten Hefeextrakten gaben sicheren Aufschluß über das Eluationsverhalten der Pyrimidinnukleotid-derivate (vgl. Abb. 13 und Tab. 5). Die simultane Registrierung der Extinktion bei den Wellenlängen 280 nm und 260 nm war eine zusätzliche Quelle für die sichere Lokalisation bestimmter Fraktionen.



Abb. 12: Die Trennung von Hefekochsaft mit dem Gradienten Nr. 4 auf der Säule B.

Da nicht alle Peaks der Hefeextrakttrennungen eindeutig zugeordnet werden konnten, wurde eine große Anzahl uns zur Verfügung stehender Reinsubstanzen jeweils zusammen mit einem Extrakt aus 200 mg Rohhefe chromatographiert. Als zusätzlicher Vergleich diente das parallel gefahrene Hefechromatogramm, das ohne Zusatz der jeweils verwendeten Reinsubstanzen entwickelt wurde.

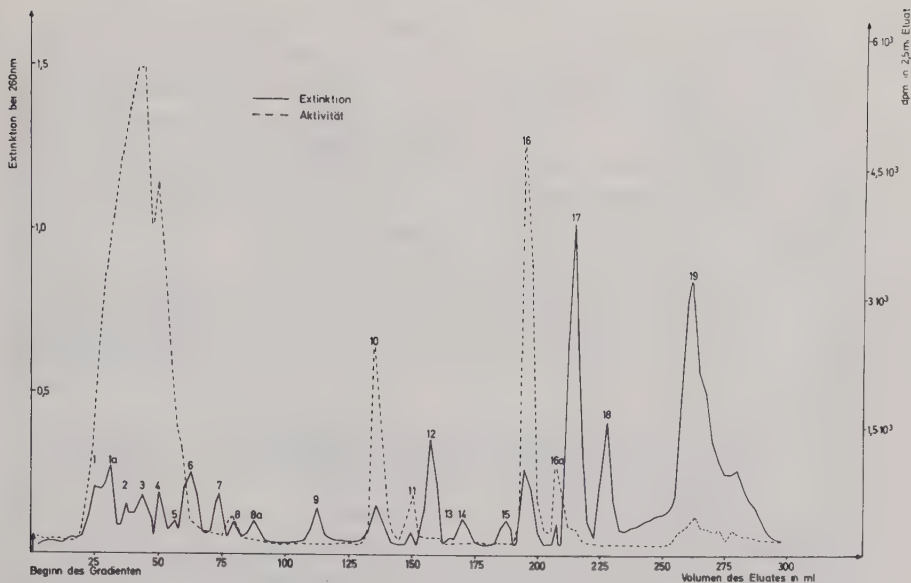


Abb. 13: Die Trennung eines mit $6\text{-}^3\text{H}$ -Uracil markierten Hefeextraktes mit dem Gradienten Nr. 4 auf der Säule B.

Auf diese Weise konnten für den Gradienten Nr. 4 die Retentionszeiten von über 40 Reinsubstanzen ermittelt werden. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen in Relation zu den mit arabischen Ziffern gekennzeichneten Hefepeaks zusammengefaßt. Die Retentionszeit bezieht sich jeweils auf die Spitze des symmetrischen Peaks.

7.6. Bisher bekannte Eigenschaften des Hefepeaks 19

Der Peak 19 stellt sich als dreigipfliger Peak und letzte Fraktion der Hefechromatogramme dar. Es wurde oben schon

Tab. 5: Einige photometrische Daten der Elutionspeaks von sauren Hefezelleextrakten

Peak	pH 2				pH 12			
	Max (nm)	Min (nm)	280/260	250/260	Max (nm)	280/260	250/260	
1	257	236	0,35	0,93	258			
1a	259	238	0,56	0,91	259	0,59	0,96	
2	248	243	0,63	1,03	-	0,59	0,97	
3	248	240	0,33	1,12	-	0,70	1,20	
4	258	240	0,48	0,95	261	0,34	1,34	
4a	260	237	0,67	0,88	239	0,51	0,91	
5	259	240	0,59	1,04	243	0,58	0,96	
6	257	231	0,24	0,90	-	1,00	1,10	
7	280	233	0,64	0,96	232	0,19	0,84	
8	256				241	0,73	0,92	
8a	-	-	0,51	1,06	-			
9	-	-	0,52	0,91	-	0,71	1,13	
10	260	240	0,55	0,92	-	1,10	0,97	
11	261	231	0,51	0,92	242	0,64	0,84	
12	268	244	0,86	0,97	248	0,70	0,95	
13	257	236	0,27	0,94	252	0,88	1,00	
14	-	-	0,77	1,08	239	0,18	0,79	
15	257	233	0,66	1,05	-	0,85	1,05	
16	-	-			233	0,74	1,03	
16a	259	233	-	-	-	-	-	
17	257	240	0,59	0,88	238	0,75	0,92	
17a	257	229	0,75	0,81	-	0,89	1,10	
18	257	229	0,23	0,85	235	0,15	0,79	
19	-	-	-	-	-	-	-	
Gesamt- extr.	256	235	0,65	0,96	246	0,61	0,98	
			0,68	0,82	238	0,49	0,85	
			0,53	0,95	242	0,49	1,02	

Tab. 6: Die Retentionszeiten der Hefepeaks und verschiedener Reinsubstanzen

Retentionszeit (min)	Lokalisation der Reinsubstanzen	Hefepeak
<u>Waschen mit H₂O:</u>		
0 - 120	Basen, Nukleoside, Aminosäuren, Riboflavin, Aneurin, Pyridoxin	Vorpeak
<u>Gradienten- elution:</u>		
0	---	--
118	Orotsäure	1a
128	NAD, ApA, Oligonukleotide	1a
146	c-AMP	--
174	---	2
200	UDP-Glukose	3
218	ADP-Glukose	4
230	UMP, d-TMP	4a
266	CMP, d-CMP	5
286	5'-AMP, 3'-AMP, 2'-AMP, d-AMP	6
350	GMP, d-GMP	7
374	1. Max. d. Riboflavin-PO ₄ -Peaks	8
390	2. Max. d. Riboflavin-PO ₄ -Peaks	8a
386	UDP-Glukuronat	8a
447	NADP	9
470	OMP, Folsäure	--
528	UDP	10
594	CDP	11
642	ADP	12
660	---	13
690	GDP	14
728	Acetyl-CoA	15
773	UTP, d-TTP	16
820	CTP, ITP	16a
852	ATP	17
896	CoA-SH	17a
912	GTP	18
1010	Adenosintetraphosphat	19

darauf hingewiesen, daß er, bedingt durch die zum Schluß steil aufsteigende Kochsalzkonzentration, besonders bei der Eluation mit günstigen, konkaven Gradienten imponiert. Zur Analyse dieser Zellfraktion wurde das entsprechende Eluat gefriergetrocknet und in wenig Wasser konzentriert aufgenommen. Mit dieser Lösung wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Die Analyse des Absorptionsverhaltens im UV-Bereich bei verschiedenen pH-Werten (vgl. Abb. 14 und Tab. 5).
2. Die Fällung mit Bariumacetat bei pH 8.5 wurde folgendermaßen untersucht:
 - a) Ein Teil des Niederschlages wurde in einem KBr-Preßling eingearbeitet und für die Aufnahme eines IR-Spektrums verwendet.
 - b) Mit dem zweiten Teil wurde eine CHN-Doppelbestimmung vorgenommen. Diese Analysen führten wir am Institut für pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie, Marburg, durch.
3. Eine Ninhydrin-Reaktion nach ACKERMANN et al., 1948.
4. Eine Nitroprussitnatrium-Reaktion nach STADTMAN, 1952.
5. Eine Prüfung der Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln und
6. eine Phosphat-Analyse nach Asid-Diagnostika, 8044 Lohof.

Ergebnisse:

Nach dem Absorptionsverhalten dieser Fraktion im UV-Licht (s. Abb. 14) läßt sie sich keinem gängigen Nukleotidderivat eindeutig zuordnen. Es sind jedoch Übereinstimmungen im Absorptionsverhalten zwischen 220 nm und 320 nm sowohl mit einem Gemisch der vier Nukleotide, UMP, CMP, AMP und GMP als auch mit dem von CASHEL, 1970, beschriebenen

Guanosinderivat, MSI, vorhanden. Der relativ hohe Phosphatgehalt des Peaks 19 unterstützt die Vermutung, daß es sich um ein Gemisch von Polyphosphatderivaten verschiedener Purin- und Pyrimidinnukleoside handeln könnte. Der Peak 19 zeigt gleiches chromatographisches Verhalten auf Anionenaustauschern wie die von CASHEL et al., 1970 beschriebenen Guanosintetraphosphate (s. auch Tab. 6 und COOPER et al., 1959) und wird mit ^3H -Uracil schwach radioaktiv markiert (vgl. Abb. 13). Die registrierten IR-Spektren waren nur unzureichend aufgelöst und ließen keine eindeutige Zuordnung zu bekannten Nukleotidderivaten zu. CHN-Analysen ergaben folgende Werte:

Kohlenstoff: 6,25 % $\pm$ 0,05
Wasserstoff: 0,43 % $\pm$ 0,03
Stickstoff : 0,27 % $\pm$ 0,0

Die relativ niedrigen Werte erklären sich unter anderem durch Verunreinigungen der Analysenprobe mit Bariumhydroxyd. Die Ninhydrin-Reaktion war negativ, die Nitroprussitnatrium-Reaktion positiv. Der Peak 19 ist in Hefezell-extrakten, die aus gerade wachsender Hefe gewonnen werden, 15 - 20 mal höher konzentriert als in Hefezellen aus einem handelsüblichen Hefeblock. Besonders hohe Werte erreicht der Gehalt dieser Fraktion während der DNS-Reduplikation (s. unten). Der Peak erscheint allerdings nur dann im Extrakt, wenn im Beisein der Hefezellen während der Neutralisation der sauren Extrakte kurzfristig alkalische pH-Werte erreicht werden. Unter sauren und neutralen Extraktionsbedingungen wird die Fraktion nicht eluiert, obwohl die Substanz in Perchlorsäure löslich ist. Die alkalischen Bedingungen scheinen folglich nur für das Freisetzen der Substanz aus der Zelle von Bedeutung zu sein. Die Fraktion ist weiterhin gut löslich in Chloroform und Dimethylsulfoxyd. Sie ist unlöslich in Äthanol, Toluol und Cyclohexan.

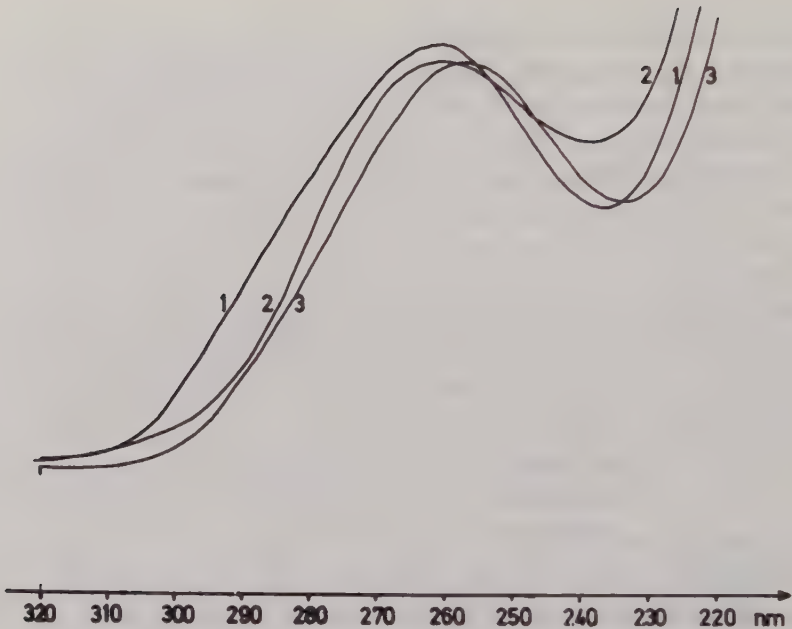


Abb. 14: Die Ultraviolett-Absorptionsspektren des Peak
Nr. 19 bei pH 2 = Kurve 1,
pH 7 = Kurve 3,
pH 12 = Kurve 2.

Dieses Lösungsverhalten und die Tatsache, daß diese Extraktfraktion erst bei hoher Ionenstärke vom Ionenaustauscher abgelöst wird, sprechen dafür, daß es sich um ein sehr polares Substanzgemisch mit lipophilen Funktionen handelt. Es muß in diesem Zusammenhang allerdings auch bedacht werden, daß die lange Retentionszeit unter Umständen auf anderen physikalisch-chemischen Absorptionsmechanismen des Säulenmaterials beruhen könnte als es die Elution bei hoher Ionenstärke zunächst vermuten läßt. Es sind zur Strukturaufklärung dieser Zellfraktionen weitaus genauere und gezieltere Analysen als die im Rahmen dieser Arbeit mehr oder weniger nur am Rande durchgeführten Untersuchungen notwendig.

7.7. Die Beständigkeit der Di- und Triphosphatderivate während eines Trennvorganges.

Von den handelsüblichen Di- und Triphosphatiden der Basen Guanin, Adenin, Uracil, Cytidin und Hypoxanthin wurden je 300 µg zur Abtrennung der Verunreinigungen chromatographiert. Das reine Di- bzw. Triphosphatderivat wurde aufgefangen und die eluierte Lösung 1:10 mit Wasser verdünnt. Die Konzentration des Nukleotidderivates in dieser Lösung wurde photometrisch bestimmt. Hierauf trugen wir die verdünnte Lösung erneut auf die Säule auf und eluierten die Substanzen mit dem Gradienten Nr. 4. Im Eluat wurde erneut die Konzentration der Di- bzw. Triphosphate gemessen.

Von den fünf untersuchten Triphosphatderivaten wurden unter unseren Analysenbedingungen 97,1 % - 101,3 % der aufgetragenen Menge wiedergefunden. Für ADP ermittelten wir einen Wert von 78 %, für die restlichen vier Diphosphatderivate Werte zwischen 91,5 % und 98 %.

7.8. Diskussion zur Anwendbarkeit dieser säulenchromatographischen Methode.

Mit Hilfe des hier beschriebenen Eluationsverfahren ist es möglich, komplex zusammengesetzte Nukleotidgemische und saure Hefezelleextrakte über PEI-Zellulosesäulen zu fraktionieren. Die Hefeextrakte werden dabei in 25 gut voneinander abgetrennte Einzelpeaks aufgelöst. Für spezielle Trennprobleme werden geeignete Modifikationen der Säule und der Gradientensysteme beschrieben (s. o.).

Wir führten in unserem Labor bisher über 300 Trennungen mit dieser Methode durch. Dabei wurden vier verschiedene Chargen der handelsüblichen PEI-Zellulose eingesetzt. Es wurden in beinahe allen Versuchen scharfe und reproduzierbare Trennergebnisse erzielt. Die Beobachtung von RUSTUM et al., 1973, PEI-Zellulose sei nur kurze Zeit haltbar und ergäbe nur unzureichende und nicht reproduzierbare Ergebnisse, kann daher nicht bestätigt werden. Wir führen dies auf die schonende und standardisierte Vorbereitung und Behandlung des Säulenmaterials zurück.

Dieser Anionenaustauscher auf Zellulosegrundlage ist allen Materialien mit Polystyronmatrix weit überlegen, da er es erlaubt, völlig ungereinigte Proben aufzutragen. Die phenolischen Extraktbestandteile, die bei Anionenaustauschern auf Polystyronbasis die Grundabsorption des Eluates stark beeinträchtigen und daher zuvor über Aktivkohle oder durch Ätherextraktion entfernt werden müssen, können bei diesem Säulenmaterial durch vorheriges Waschen mit Wasser eliminiert werden. Diese Eigenschaft der PEI-Zellulose ist für die äußerst konstante und geringe Grundabsorption des Eluates verantwortlich. Im Gegensatz zu den Polystyronharzsäulen wurden in unserem Labor für jede Trennung frische PEI-Zellulosesäulen verwendet. Es ist möglich, eine Säule durch Waschen mit 4,0 M Kochsalzlösung und Wasser wieder zu regenerieren. Allerdings hat es sich gezeigt, daß bei wiederholter Anwendung der Widerstand allmählich zunimmt und die Säule in der Regel nach der dritten bis fünften Trennung verstopft ist.

Es werden je nach Wahl des Gradienten vollständige Trennungen von Nukleotidgemischen in 10 - 16 Stunden erzielt. Während dieser Zeit erübrigt sich bei Verwendung eines konkaven Gradienten eine Überwachung der Analyse.

Durch das geringe Eluationsvolumen von nur 210 bis maximal 300 ml wird eine große Nachweisempfindlichkeit erreicht. In diesen Punkten ist die Methode allen eingangs erwähnten Verfahren weit überlegen.

Ein Zusatz von 0,02 % Tween 20 zu dem entgasten Wasser im Mischgefäß verhindert das Hängenbleiben von Luftblasen im Strahlengang der Küvette. Es können so Küvetten mit außerordentlich kleinem Totraum bedenkenlos eingesetzt werden. Die Trenneigenschaften des Säulenmaterials werden durch das Tensid nicht nachteilig beeinflusst.

Setzt man gut entgaste Eluationsflüssigkeiten ein, so bleibt der pH-Wert der die Säule verlassenden Lösung in einem Bereich von pH 6,5 - 7,0. Lediglich während des Waschens mit Wasser und zu Beginn der Gradientenelution werden kurzfristig pH-Werte bis zu 4,0 gemessen. Hier spielen Hydrolysereaktionen der an diesen Stellen eluierten Stoffe eine Rolle (s. o.).

Durch den Einsatz von Lithiumchloridlösungen als Eluationsmittel werden unter gleichen Bedingungen ebenso gute Trennergebnisse erzielt wie mit Kochsalz. Lithiumchlorid läßt sich mit Aether-Aethanol-Gemischen aus dem Eluat ausschütteln, so daß es auf diese Weise gelingt, die Fraktionen zu entsalzen.

Es wurden die Eluationspeaks von Hefechromatogrammen beschrieben und zum Teil auch identifiziert. Die Fraktionen 2,15 und 19 konnten bisher noch nicht eindeutig entsprechenden Reinsubstanzen zugeordnet werden. Der Peak 17 besteht zum überwiegenden Teil aus ADP. Es ist jedoch erwähnenswert, daß für diese Fraktion bei einzelnen Hefeproben bei 280 nm ein Doppelpeak geschrieben

wird, obwohl die gleichzeitige Messung bei 260 nm einen völlig einheitlichen, symmetrischen Peak ergibt. Dieses Phänomen konnte bisher noch nicht gedeutet werden.

Die Thymidinphosphate werden zusammen mit den Uracil-derivaten in einer Fraktion eluiert. Das gleiche gilt für die Cytosin- und Inosinnukleotide. Eine Trennung der Desoxyderivate von den entsprechenden Ribonukleotiden gelingt unter diesen Bedingungen nicht. Für solche Fragestellungen ist eine vorherige Trennung dieser Gruppen, z. B. über 3-Aminobenzolboronsäure gebunden an succinylierte Aminododecylzellulose (vgl. SCHOTT et al., 1973) erforderlich.

Für über 40 Reinsubstanzen wurden die Retentionszeiten für die Eluation der Säule B mit dem Gradienten Nr. 4 ermittelt (vgl. Tab. 6). OMP und UDP-Glukuronat trennen sich gut von den anderen Fraktionen ab. Auf diese Weise erlaubt die Methode, quantitative Untersuchungen des Orotsäurestoffwechsels durch Markierung mit ^{14}C -Orotsäurederivaten vorzunehmen (vgl. KUNZ Lit. 62).

Der Redox-Zustand der Zelle zum Zeitpunkt der Ernte kann durch Trennung der reduzierten von den oxidierten Anteilen des NADP- und NAD-Pools beurteilt werden. Die reduzierten Dinukleotide hydrolysieren bei saurer Extraktion quantitativ unter Abspaltung des Nikotinsäureamids zu Adenosin-2'-Monophosphat-5'-Diphosphoribose bzw. Adenosin-5'-Diphosphoribose. Diese Derivate haben eine freie Säurefunktion mehr als die entsprechenden Ausgangssubstanzen und werden daher weit hinter den oxidierten Derivaten, die nicht hydrolysieren, eluiert. In diesem Zusammenhang sei auch auf die mögliche Anwendung der Säule zu Analysen der für die Regulations-

mechanismen der DNS-Reduplikation als äußerst wichtig erachteten NAD- und poly-NAD-Derivate hingewiesen (vgl. BORZIO et al., 1972).

Durch alkalische Hydrolyse von 7-Methylguanin wird die Bindung zwischen C 8 und C 9 hydrolytisch gespalten. Das Hydrolyseprodukt besitzt daher eine zusätzliche Karboxylfunktion und kann so auf der Säule von den nicht spaltbaren Guanosinderivaten getrennt werden. Für diese Beobachtungen und persönliche Mitteilung bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. KUNZ, Pharmakologisches Institut der Universität Tübingen.

Die Vorteile dieser Methode gegenüber den einleitend erwähnten, bisher bekannten säulenchromatographischen Trennverfahren sind:

1. Das Arbeiten bei neutralem pH-Wert,
2. die kurzen Analysenzeiten,
3. die Verwendbarkeit von ungereinigten Rohextrakten,
4. das geringe Eluationsvolumen und die hohe Nachweisempfindlichkeit (auch durch die Einsatzmöglichkeit von Spezialküvetten),
5. die Tatsache, daß die Analyse keiner Überwachung durch eine Aufsichtsperson bedarf sowie
6. die hohe Reproduzierbarkeit der Trennergebnisse und geringe Störanfälligkeit der Methode.

Diese Eigenschaften und die relativ einfache, apparative Ausstattung lassen diese Methode zu einer Bereicherung der analytischen Möglichkeiten eines jeden Labors werden. In der Diskussion wurde auf verschiedene Anwendungsmöglichkeiten für Analysen der Nukleinsäure- und Nukleotidchemie hingewiesen.

8. Die Anwendung der Säule zu analytischen Untersuchungen unterschiedlich vorbehandelter saurer Hefeextrakte

Es ist in vielen Fällen unmöglich, Ergebnisse verschiedener biochemischer Untersuchungen miteinander zu vergleichen, da scheinbar geringfügige Abweichungen der Analysenverfahren zu gravierenden Veränderungen der Versuchsergebnisse führen. Daher erschien es uns zwingend notwendig, zu untersuchen, ob und in welcher Größenordnung mit Veränderungen der Extraktzusammensetzung bei verschiedenen Erntemethoden und Lagerungsbedingungen der Hefezellen und Extrakte sowie bei Extraktions- und Neutralisationseinflüssen zu rechnen ist.

Es wurden für diese Analysen vergleichbare Hefeproben, nach den verschiedenen Gesichtspunkten variiert, aufgearbeitet und über die Säule B in Einzelfractionen aufgetrennt. Die mit der LKB-Uvicord-Überwachungsanlage registrierten Transmissionsspektren wurden, wie unter Material und Methoden beschrieben, quantitativ ausgewertet. Wir wählten dieses aufwendige Auswertungsverfahren aus folgenden Gründen:

1. Durch die Registrierung der Transmissionswerte werden die Fehler gegenüber einer Extinktionsregistrierung für kleine Peaks relativ klein gehalten, während große Peaks durch die lineare Maßstabsveränderung etwas gestaucht werden und
2. wird der Nachteil eliminiert, daß bei Extinktionsregistrierung ein bestimmter Abschnitt der Extinktionsskala ausgewählt werden muß.

Hierbei kann es vorkommen, daß konzentrierte Fraktionen den gewählten Skalenabschnitt überschreiten und dann nicht planimetrisch ausgewertet werden können.

Folgende Fraktionen der Hefeextrakte wurden zusammengefaßt und miteinander verglichen:

- F_1 = Vorpeak
- F_2 = Hefepeaks 1 - 4
- F_3 = Monophosphatfraktion
- F_4 = Diphosphatfraktion und
- F_5 = Triphosphatfraktion

Ferner wurde für die Auswertung die Gesamtmenge einzelner Fraktionen herangezogen. Es werden in Tabellen und Diagrammen folgende Summen gegenübergestellt:

- S_1 = die Summe der Mono-, Di- und Triphosphate
- S_2 = $S_1 + F_2$ und
- S_3 = die Summe der Fraktionen F_1 bis F_5 , ohne den Peak 19.

Zu der Fraktion F_2 ist anzumerken, daß quantitative Unterschiede, wie aus den Überwachungschromatogrammen hervorgeht, überwiegend durch den Oligonukleotidanteil dieser Fraktion, den Peak 1, hervorgerufen wurden.

Die Versuche wurden so angelegt, daß die zu untersuchende Störgröße in zwei oder mehreren deutlich voneinander verschiedenen Variationen analysiert werden konnte. Andere Störgrößen wurden durch streng parallele Behandlung der Proben vermieden. Die gemittelten Ergebnisse aus mehreren Versuchen werden in Form von Quotienten zusammengefaßt, indem der Mittelwert einer Variante durch den der anderen dividiert wird. Durch Multiplikation dieser Quotienten mit 100 erhält man folglich die prozentuale Relation der Extremwerte einer Einflußgröße auf die Extraktzusammensetzung.

8.1. Der Einfluß verschiedener Ernteverfahren auf die Zusammensetzung der Hefezelleextrakte

Für das Kriterium 'Ernte der Hefezellen' wurden die Einwirkungen folgender Variationen auf die Zusammensetzung und Menge der Extrakte untersucht:

- Variation I: Die Ernte auf einem Membranfilter.
- Variation II: Extraktion der säurelöslichen Zellbestandteile ohne Abtrennung des Nährmediums.
- Variation III: Schnelles Abzentrifugieren der Hefezellen aus dem Nährmedium.
- Variation IV: Schnelles Einfrieren der Nährmedium-Hefe-Suspension.

8.1.1. EXPERIMENTELLES:

Der Einfluß der Ernteparameter wurde durch Auswertung der beiden Hefewachstumsversuche A und B ermittelt.

Versuch A:

Synchronisierte Hefezellen wurden unter Standardbedingungen von Anfang an unter Zusatz des Vitamingemisches inkubiert. Nach drei Stunden ernteten wir vier Proben (je 230 mg Hefe) nach vier Erntevariationen. 30 min später wurden nochmals vier Proben in gleicher Weise entnommen.

Die in Tabelle 7 angegebenen Zahlen sind die Mittelwerte der entsprechenden Hefeproben zum Zeitpunkt 3 h und 3 1/2 h.

Die Beschreibung der Ernteverfahren

Variation I $\hat{=}$ A1:

Die Hefe wird wie unter Material und Methoden beschrieben unter Standardbedingungen geerntet (vgl. Lit. 86, 102, 120).

Variation II $\hat{=}$ A2:

Die mit einer Pipette entnommene Hefesuspension wird sofort mit -20° C kalter 6,0 N Perchlorsäure versetzt, 15 min lang bei 2° C extrahiert und die Zellen abzentrifugiert. Der Überstand wird als Extrakt weiterverarbeitet.

A2a: Die Endkonzentration beträgt 0,6 N Perchlorsäure.

A2b: Die Endkonzentration beträgt 0,3 N Perchlorsäure.

Wegen der im Extrakt enthaltenen Ionen aus dem Nährmedium werden die gefriergetrockneten Extrakte in 50 ml Wasser auf die Säule aufgetragen.

Variation IV $\hat{=}$ A3:

Die Hefesuspension wird bei -80° C eingefroren und bei -20° C aufbewahrt. Nach dem Auftauen im 2° C warmen Wasserbad (mehrere Stunden) wird scharf abzentrifugiert. Die Hefezellen werden analog den anderen Variationen extrahiert und weiterverarbeitet. Dieses Verfahren wurde von HAERTEL und STOSSEK angewandt.

Versuch B:

Der Versuch B war bis auf folgende Unterschiede mit den Bedingungen des Versuches A identisch: Es wurden hier je 3 Proben zu den Zeiten 240 min, 255 min und 270 min nach Versuchsbeginn geerntet. Die in Tabelle 7 angegebenen Werte

sind daher Mittelwerte der entsprechenden drei Hefeproben.

Variation I $\hat{=}$ B 1 :

Es wurde analog A 1 verfahren.

Variation III $\hat{=}$ B 2 :

Die mit einer Pipette entnommene Hefesuspension wird in der Stockzentrifuge maximal 2 min zentrifugiert, das Nährmedium verworfen und die Hefezellen sofort mit 0,6 N Perchlorsäure extrahiert. Die Variation wurde in ähnlicher Weise von DEHNER, FREUND, LANGBEHN und PANKOTSCH angewendet.

Variation IV $\hat{=}$ B 3 :

Das analytische Vorgehen unterscheidet sich im Prinzip nicht von A 3. Hier wird die Hefesuspension lediglich, um ein schnelleres Einfrieren und Auftauen zu gewährleisten, unter ständigem Rühren in acht kleinen Portionen eingefroren.

8.1.2. Ergebnisse und Diskussion.

Die Tabelle 7 enthält die Werte der einzelnen Extraktfraktionen sowie der verschiedenen Summen, angegeben in Milligramm Papiergewicht, und die prozentuale Verteilung der einzelnen Fraktionen bezogen auf die entsprechenden Summen. Die Histogramme (Abb. 15 und 16) illustrieren einen Teil dieser Ergebnisse. Die in diesen Histogrammen eingezeichneten waagerechten Markierungen geben an, wie groß die Abweichung des höchsten und niedrigsten Wertes vom Mittelwert ist.

Es soll hier noch einmal darauf hingewiesen werden, daß die entsprechenden Erntevarianten nur innerhalb des

Tabelle 7

A: Die absoluten Werte in planimetrischen Einheiten (mg/Papiergew.) der Heferversuche A (Mittelwerte aus 2 Vers.) und B (Mittelwerte aus 3 Versuchen) sowie der Summen einzelner Extraktfraktionen.

	F1	F2	F3	NADP P9	F4	Peak 15	F5	Peak 19	Gesamt- Summe	S1	S2	S3
A 1	348,5	97,1	386,0	11,3	97,9	19,7	145,0	526,0	1631,4	628,9	725,9	1105,4
A 2a	1957,4	-,-	-,-	-,-	87,7	-,-	340,3	801,0	3186,4	428,0	-,-	2385,4
A 2b	1501,2	-,-	-,-	-,-	43,8	-,-	166,9	486,5	2198,2	210,6	-,-	1711,8
A 3	116,5	29,4	72,3	19,4	14,1	4,5	38,0	381,4	675,4	124,3	153,7	255,0
B 1	565,8	120,0	378,5	20,4	124,4	70,5	324,0	97,8	1610,7	736,6	856,6	1512,9
B 2	455,0	30,1	156,1	14,6	148,2	42,4	222,4	570,6	1643,8	531,2	561,3	1073,2
B 3	190,8	31,5	47,5	0,5	21,6	15,0	30,4	394,7	731,9	99,3	130,8	337,1

B: Die prozentuale Verteilung einzelner Fraktionen, bezogen auf die entsprechenden Summen.

	%M	S1 %D	%T	%Oligo	%M	S2 %D	%T	%Vorpeak	%Oligo	S3 %M	%D	%T
A 1	63,8	16,7	19,5	15,2	53,9	14,1	15,2	33,0	9,8	34,9	9,1	11,0
A 2a	-,-	20,5	79,5	-,-	-,-	-,-	-,-	82,1	-,-	-,-	3,6	14,3
A 2b	-,-	22,2	77,8	-,-	-,-	-,-	-,-	87,7	-,-	-,-	2,6	9,7
A 3	54,1	10,0	36,0	18,9	43,8	8,0	29,3	40,5	9,7	22,7	4,2	14,4
B 1	51,4	16,8	31,8	14,0	44,2	14,4	27,3	37,3	7,9	25,0	8,3	15,5
B 2	29,7	28,6	41,7	5,3	28,1	27,1	39,5	42,6	2,7	14,6	14,2	20,6
B 3	49,3	22,1	28,6	24,2	37,3	16,7	21,8	57,3	9,3	14,4	6,5	8,4

Anmerkung: In Tabelle 7 B ist die prozentuale Verteilung von Peak 9 und Peak 15 nicht aufgeführt.

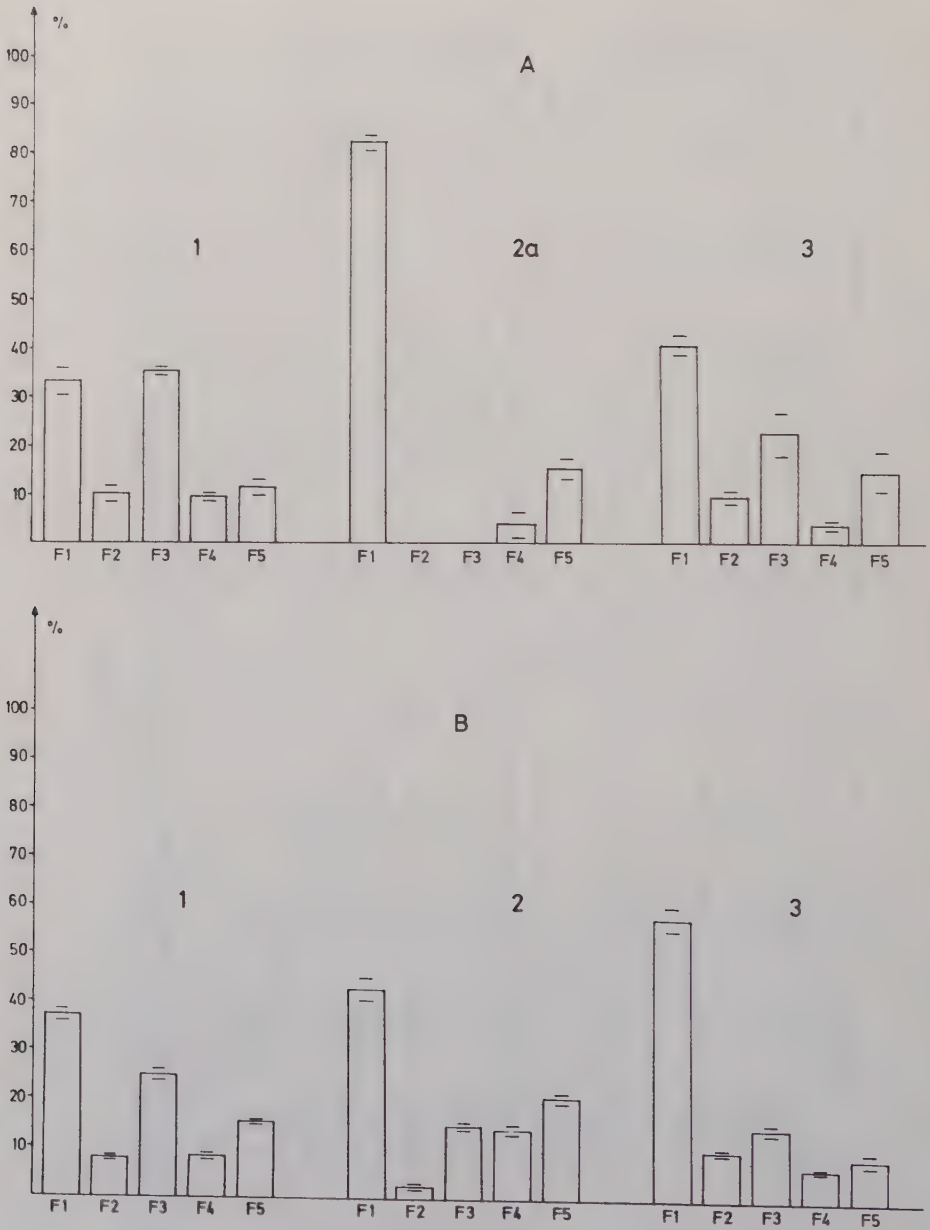


Abb. 15: Die prozentuale Verteilung der Extraktfraktionen für die Heferversuche A und B.

Versuches A bzw. B verglichen werden können, da diese beiden Versuche an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden. Die Hefeproben sind auch zu ungleichen Zeitpunkten geerntet worden.

Die Abb. 15 zeigt für die verschiedenen Ernteverfahren zum Teil erhebliche Differenzen in der prozentualen Verteilung der einzelnen Zellfraktionen. Der ausgesprochen hohe Anteil des Vorpeaks bei Variation II (A 2) ist hervorgerufen durch den vom Nährmedium herrührenden, hohen Salzgehalt der Proben. Trotz der durchgeführten Verdünnung werden sämtliche Zellbestandteile von Peak 1 bis etwa Peak 11 mit Wasser schon im Vorpeak eluiert. Aus den entsprechenden Überwachungsspektren ist ersichtlich, daß wohl der größte Teil der Diphosphat- und ein geringer Teil der Triphosphatfraktion nicht von der Säule retiniert werden. Eine scharfe Auftrennung der Fraktionen F 4 und F 5 kann daher nicht erwartet werden.

Die Variation I, die Ernte der Hefezellen auf einem Membranfilter, zeichnet sich im Vergleich zu den anderen Verfahren durch einen hohen Anteil an Oligonukleotiden und Monophosphaten aus. Dieses Ergebniss sowie die Hinweise aus Markierungsversuchen (s. u.) lassen vermuten, daß der Anstieg dieser Fraktionen auf einen enzymatischen Abbau von höhermolekularen Nukleinsäurederivaten zurückzuführen ist (s. Abb. 17). Hierbei spielen unter Umständen Temperaturveränderungen, die vollständige Abtrennung der Hefezellen von der umgebenden Flüssigkeit und die osmotische Belastung eine entscheidende Rolle. Man findet ähnliche Verteilungen der Zellfraktionen bei der Extraktion von "trockener Hefe". Hiermit sind Hefezellen aus einem handelsüblichen 500 g Hefeblock gemeint (vgl. Abschnitt 8.3.).

Hydrolyisereaktionen der Di- und Triphosphate zu Monophosphaten sind in diesem Zusammenhang zu vernachlässigen. Zu dieser Feststellung berechtigt der Vergleich der absoluten Zahlen der Fraktionen F 4 und F 5 für die Erntevarianten I und III (vgl. Tab. 7, B 1 und B 2). Auch bei sofortigem Einfrieren der Hefesuspension werden relativ hohe Werte der Fraktionen F 2 und F 3 gefunden.

Da bei dem Einfrieren von 100 ml Hefesuspension die Temperatur nicht schlagartig auf ausreichend tiefe Werte zu senken ist, können auch hier katabole enzymatische Reaktionen angenommen werden. Die Erntevariation III (s. Probe B 2 in Tab. 7 B und Abb. 15 B) ist in dieser Hinsicht am schonensten. Die Triphosphatfraktion ist hier nach der heterogen zusammengesetzten Vorpeakfraktion der quantitativ zweitgrößte Extraktbestandteil. Der Vergleich der absoluten Zahlen von B 1 und B 2 (s. Tab. 7 A) zeigt deutliche Differenzen für den Gehalt an Fraktion F 2 und F 3. Die Fraktion F 2 macht bei B 2 nur 25 %, die Fraktion F 3 etwa 50 % der mit der Variation I gefundenen Menge aus.

Die Abb. 16 illustriert die absoluten Werte der extrahierbaren, uv-absorbierenden Zellbestandteile. Es sind die Summen S 1 und S 3 der einzelnen Erntevariationen dargestellt. Es ergeben sich außerordentlich große Unterschiede mit verschiedenen Analysenverfahren. Die höchsten Werte liefert die Extraktion der Hefezellen ohne vorherige Abtrennung des Nährmediums, die Variation II (s. Probe A 2 a). Dies ist zu erwarten, da auf diese Weise sowohl die extrahierbaren Zellbestandteile als auch im Nährmedium vorhandene Substanzen und Metabolite miterfasst werden. Aus Tabelle 7 A geht hervor, daß mit 0,6 N Perchlorsäure (Probe A 2a) mehr extrahiert wird

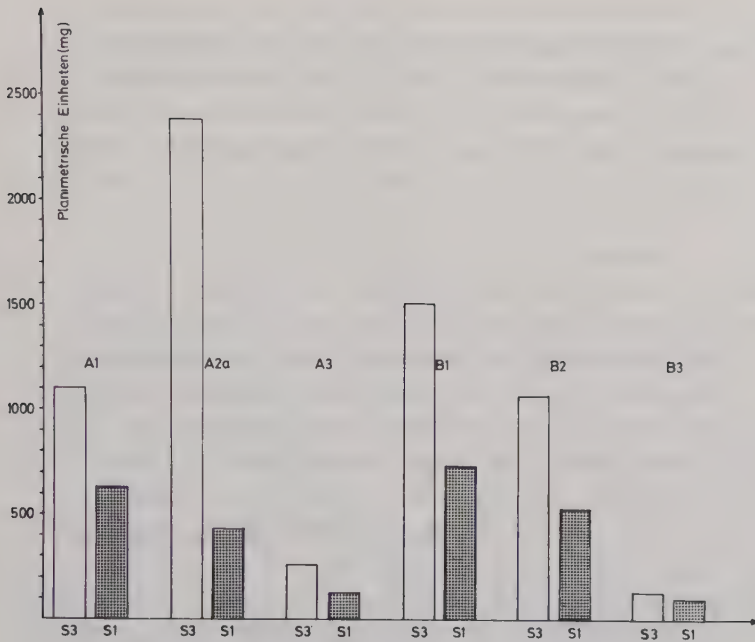


Abb. 16: Die absoluten Mengen der Summen S 1 und S 3 der Heferversuche A und B.

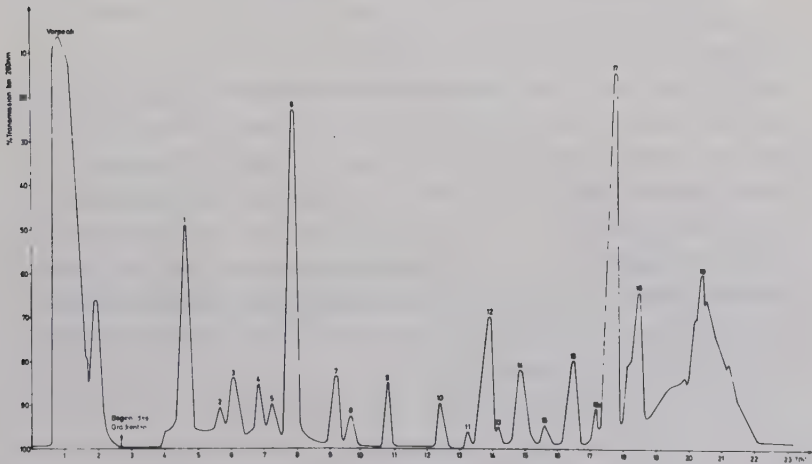


Abb. 17: Das Chromatogramm einer Hefeprobe, die auf einem Membranfilter geerntet wurde.

als mit 0,3 N Perchlorsäure (Probe A 2b). Dies erklärt sich aus einer größeren Schädigung der Zellwand durch die konzentriertere Säure. Die übrigen Ernteverfahren liefern im Vergleich mit Variation II über 50 % weniger Gesamtextrakt, da hier die im Nährmedium gelösten Anteile mit diesem verworfen werden.

Mit der Erntevariation IV (vgl. A 3 und B 3 in Abb. 16) erhält man jedoch für beide dargestellten Summen ausgesprochen niedrige Werte. Hier geht offensichtlich auch ein großer Anteil der Phosphatester verloren. Photometrische Untersuchungen der Nährmediumüberstände haben bestätigt, daß das Nährmedium nach vorherigem Einfrieren der Hefesuspension 80 % - 90 % der Nukleotidfraktion aufnimmt, die dann nach dem Abtrennen der Hefezellen mit dem Überstand verworfen werden. Durch das Einfrieren werden die Zellwände der Hefe so stark geschädigt, daß sie ihre spezifische Funktion, lebensnotwendige Stoffe in der Zelle konzentriert speichern zu können, mehr oder weniger verlieren. Wie Abb. 15 zeigt, bleibt jedoch das prozentuale Verhältnis der einzelnen Extraktfraktionen im Vergleich zu anderen Ernteverfahren in etwa erhalten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Variation III von den hier untersuchten Verfahren die den Konzentrationsverhältnissen der lebenden Hefezelle ähnlichsten Resultate liefert. Es ist hier mit ausreichenden Extraktmengen und nur in geringem Maße mit Veränderungen der Extraktzusammensetzung zu rechnen. Die Variationen I und IV liefern verhältnismäßig hohe Anteile von Hydrolyseprodukten höhermolekularer Nukleinsäurederivate. Außerdem geht bei Variation IV der größte Teil der säurelöslichen Zellbestandteile verloren.

Die Variation II ist für die Ionenaustauschchromatographie unbrauchbar, solange es nicht gelingt, die Extrakte zu entsalzen. Berücksichtigt man schätzungsweise den durch die Ionenstärke des Extraktes bedingten Verlust an Mono- und Diphosphaten, so ist zu vermuten, daß die Variation II nicht wesentlich mehr Phosphatester liefert als z. B. die Variationen I und III.

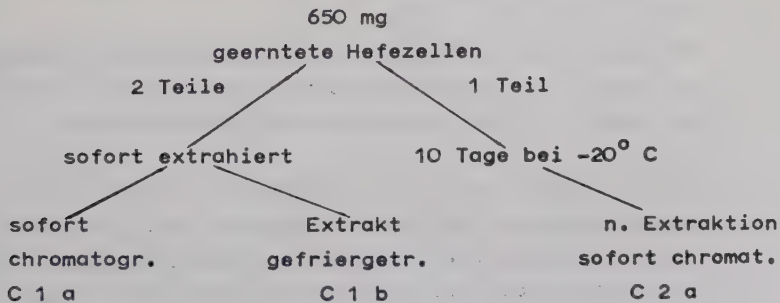
8.2. Der Einfluß der Lagerungsbedingungen von Hefezellen und Extrakten auf die Extraktzusammensetzung.

Der Einfluß dieser beiden Störgrößen wurde durch Auswertung der beiden Heferversuche C und D untersucht.

Beschreibung der Versuchsbedingungen:

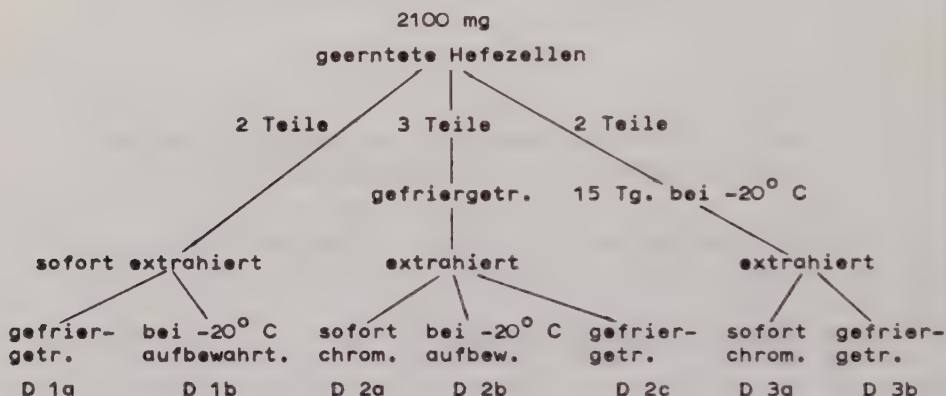
Versuch C:

Synchronisierte Hefezellen wurden unter Standardbedingungen inkubiert. Der Zusatz des Vitamingemisches erfolgte nach 3 h Wachstum. Nach einer Inkubationszeit von 280 min wurde die Hefe auf einem großen Membranfilter gesammelt und nach folgendem Schema aufgearbeitet:



Versuch D:

Nach 315 min Inkubationszeit wurde die Hefe geerntet und nach unten dargestelltem Schema analysiert. Im Übrigen wurden die gleichen Versuchsbedingungen wie bei Versuch C eingehalten.



8.2.1. Die Lagerung der Hefezellen.

Folgende Variationen der Hefezellaufbewahrung wurden miteinander verglichen:

Variation I: sofort extrahiert und chromatographiert.

Variation II: Aufbewahrung der Hefezellen bei -20° C.

Variation III: Gefriertrocknung der Hefezellen.

Die Variation I dient als Vergleich, da hier keine Lagerungsbedingten Einflüsse vorhanden sind. Für die Berechnung der Quotienten wurden die entsprechenden Versuchsergebnisse (vgl. Tab. 8) nach folgenden Schemata ins Verhältnis gesetzt:

$$Q_1 = \frac{\text{Var. I}}{\text{Var. II}} = \frac{D_{1a}}{D_{3b}}$$

$$Q_2 = \frac{\text{Var. I}}{\text{Var. III}} = \frac{D_{1a} + D_{1b}}{D_{2b} + D_{2c}}$$

$$Q_3 = \frac{\text{Var. II}}{\text{Var. III}} = \frac{D_{3a} + D_{3b}}{D_{2a} + D_{2c}}$$

Ergebnisse und Diskussion.

Die Tabellen 8 und 9 fassen die Ergebnisse zusammen. Die Abbildung 18 stellt die Quotienten der Tabelle 9 graphisch dar. Wie aus dieser Darstellung hervorgeht werden bei sofortiger Extraktion und Analyse wesentlich geringere Mengen Extrakt gewonnen als wenn die Hefe zuvor nach Variation II oder III gelagert wird.

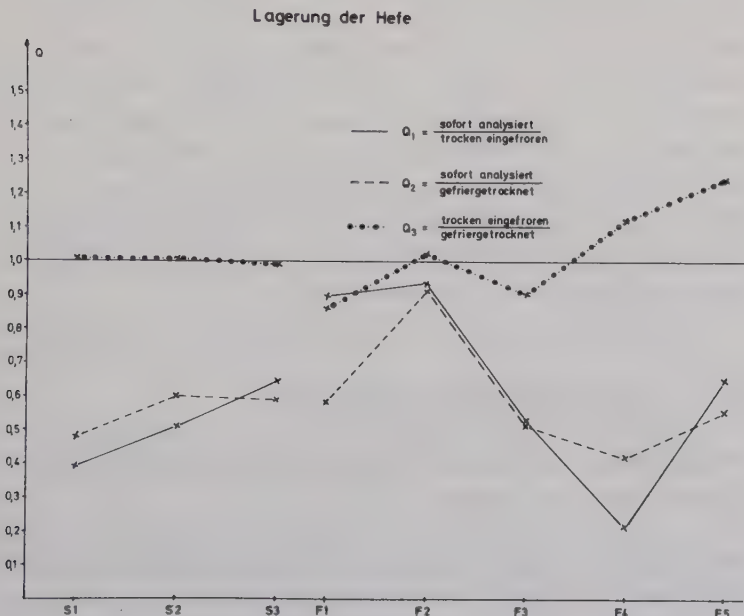


Abb. 18: Die Darstellung der Quotienten aus Tabelle 9.

Ein Vergleich der drei Summen S 1, S 2 und S 3 zeigt, daß dieser Befund für die Summe S 1, die Nukleotidfraktion, am deutlichsten ausgeprägt ist. Die Variationen II und III unterscheiden sich in dieser Hinsicht nicht voneinander. Die einzelnen Zellfraktionen werden in gleicher Weise wie die Extraktmenge beeinflusst. Es liegt daher nahe, daß die verbesserten Extraktionsbedingungen durch Einfrieren und Gefrier-trocknen der Hefezellen auf mechanische Mechanismen zurückzuführen sind. Es müssen hier Zellwandschädigungen und für die gefriergetrockneten Zellen zusätzlich ein "Schwammeeffekt" diskutiert werden (vgl. Abschnitt 8.1.).

Ob bedingt durch die Aufbewahrung der Hefezellen die Extraktzusammensetzung auch durch hydrolytische Abbaureaktionen von polymeren und empfindlichen, monomeren Zellbestandteilen verändert wird, läßt sich nach diesen Analysen nicht mit Sicherheit entscheiden. Da die quantitativen Unterschiede für die Fraktionen F 1 und F 2 weniger stark ausgeprägt sind, erscheinen Hydrolysereaktionen jedoch unwahrscheinlich. In diesen beiden Fraktionen sowie in dem Monophosphatpool wären die Hydrolyseprodukte zu erwarten.

8.2.2. Die Lagerung der Hefeextrakte.

Folgende Möglichkeiten der Extraktverarbeitung werden miteinander verglichen:

- Variation I: Der Extrakt wird sofort chromatographiert.
- Variation II: Der Extrakt wird gefriergetr. aufbewahrt.
- Variation III: Der Extrakt wird bei -20° C eingefroren.

Tabelle 8

A: Die absoluten Werte in planimetrischen Einheiten (mg Papiergew.) der Heferversuche C und D sowie der Summen einzelner Extraktfraktionen.

	F1	F2	F3	NADP P9	F4	Peak 15	F5	Peak 19	Gesamt- summe	S1	S2	S3
C 1a	415,7	208,0	310,5	18,9	254,5	-,-	256,7	1594,8	3059,1	821,7	1029,7	1464,2
C 1b	847,2	123,7	190,4	18,4	142,1	42,4	150,7	538,0	2052,9	478,2	606,9	1514,9
C 2a	378,7	208,9	287,8	17,4	73,4	3,2	11,2	769,5	1756,1	378,4	587,3	986,6
D 1a	247,0	104,6	14,4	3,6	23,0	7,0	18,2	-,-	518,5	156,3	260,9	518,5
D 1b	227,0	144,5	95,7	7,8	52,0	-,-	37,6	-,-	564,6	185,3	329,8	564,6
D 2a	126,0	128,1	359,7	10,1	101,4	21,6	61,7	-,-	808,6	522,4	650,9	808,6
D 2b	366,1	137,0	197,6	11,8	71,3	17,5	32,6	-,-	833,9	301,5	438,5	833,9
D 2c	443,1	135,5	209,5	9,8	134,9	11,2	68,5	-,-	1012,5	412,9	548,4	1012,5
D 3a	218,1	158,0	276,7	8,7	158,9	11,2	107,6	260,5	1259,7	543,2	701,2	999,2
D 3b	274,9	111,5	238,6	5,0	106,7	10,8	54,5	-,-	802,0	399,8	511,3	802,0

B: Die prozentuale Verteilung einzelner Fraktionen, bezogen auf die entsprechenden Summen.

	% M	S1 % D	% T	% Oligo	% M	S2 % D	% T	% Vorpeak	% Oligo	S3 % M	% D	% T
C 1a	37,8	31,0	31,2	20,2	30,2	24,7	24,9	28,4	14,2	21,2	17,4	17,5
C 1b	39,4	29,4	31,2	20,4	31,4	20,4	24,8	55,9	8,2	12,6	9,4	9,9
C 2a	76,1	21,0	3,0	35,6	49,0	13,5	1,9	38,4	21,2	29,2	8,0	1,1
D 1a	73,2	15,2	11,6	40,1	43,8	9,1	7,0	47,6	20,2	22,1	4,6	3,5
D 1b	51,6	28,1	20,3	43,8	29,0	15,8	11,4	40,2	25,6	17,0	9,2	6,7
D 2a	68,8	19,4	11,8	16,7	55,3	15,6	9,5	15,6	15,8	44,5	12,5	7,6
D 2b	65,5	23,6	10,9	31,2	45,1	16,3	7,4	43,9	16,4	23,7	8,6	3,9
D 2c	50,7	32,7	16,6	24,7	38,2	24,6	12,5	43,8	13,4	20,7	13,3	6,8
D 3a	50,9	39,3	19,8	22,6	39,5	22,7	15,3	27,8	15,8	27,7	15,9	10,8
D 3b	59,7	26,7	13,6	21,8	46,7	20,9	10,7	34,3	13,9	29,8	13,3	6,8

Anmerkung: In Tabelle 8 B ist die prozentuale Verteilung von Peak 9 und Peak 15 nicht aufgeführt.

Tabelle 9: Lagerung der Hefe.

	sofort extrah.	: :	eingefroren	= =	Q ₁	sofort extrah.	: :	gefriergetr.	= =	Q ₂	eingefroren	: :	gefriergetr.	= =	Q ₃
Norpeak	247,0	:	274,9	=	0,899	237,0	:	404,6	=	0,586	246,5	:	284,6	=	0,866
Oligo	104,6	:	111,5	=	0,938	124,6	:	136,3	=	0,915	134,8	:	131,8	=	1,024
Mono	114,4	:	238,6	=	0,479	105,1	:	203,6	=	0,516	257,7	:	284,6	=	0,905
Di	23,7	:	106,7	=	0,222	37,9	:	103,1	=	0,368	132,8	:	118,2	=	1,124
Tri	7,0	:	10,8	=	0,648	27,9	:	50,6	=	0,551	81,1	:	65,1	=	1,246
S 1	156,3	:	399,8	=	0,391	170,8	:	357,2	=	0,478	471,5	:	467,9	=	1,008
S 2	260,9	:	511,3	=	0,510	295,4	:	493,5	=	0,599	606,3	:	599,7	=	1,011
S 3	518,5	:	802,0	=	0,646	541,6	:	923,2	=	0,587	900,6	:	910,6	=	0,989

Tabelle 10: Lagerung der Extrakte.

	sofort chromat.	: :	gefriergetr.	= =	Q ₁	sofort chromat.	: :	eingefroren	= =	Q ₂	eingefroren	: :	gefriergetr.	= =	Q ₃
Vorpeak	172,1	:	359,0	=	0,479	126,0	:	366,1	=	0,344	296,6	:	345,1	=	0,859
Oligo	143,1	:	123,5	=	1,159	128,1	:	137,0	=	0,935	140,8	:	120,1	=	1,172
Mono	318,2	:	224,1	=	1,420	359,7	:	197,5	=	1,820	141,7	:	162,0	=	0,875
Di	130,2	:	120,8	=	1,078	101,4	:	71,2	=	1,422	61,7	:	79,3	=	0,778
Tri	84,7	:	61,5	=	1,377	61,7	:	32,6	=	1,893	35,1	:	43,4	=	0,809
S 1	533,0	:	406,4	=	1,312	522,8	:	301,5	=	1,734	243,4	:	284,6	=	0,855
S 2	676,1	:	529,9	=	1,276	650,9	:	438,5	=	1,484	384,2	:	404,7	=	0,949
S 3	903,9	:	907,3	=	0,996	808,6	:	833,9	=	0,970	699,3	:	765,5	=	0,914

Die Berechnung der Quotienten wurde durch Division der Versuchsergebnisse nach folgenden Schemata vorgenommen:

$$Q_1 = \frac{\text{Var. I}}{\text{Var. II}} = \frac{C_{1a} + D_{2a} + D_{3a}}{C_{1b} + D_{2c} + D_{3b}}$$

$$Q_2 = \frac{\text{Var. I}}{\text{Var. III}} = \frac{D_{2a}}{D_{2b}}$$

$$Q_3 = \frac{\text{Var. III}}{\text{Var. II}} = \frac{D_{1b} + D_{2b}}{D_{1a} + D_{2c}}$$

Ergebnisse und Diskussion.

Die Ergebnisse dieser Analysen sind den Tabellen 8 und 10 sowie der Abbildung 19 zu entnehmen. Die Nukleotidmenge S 1 ist bei Variation I wesentlich größer als bei

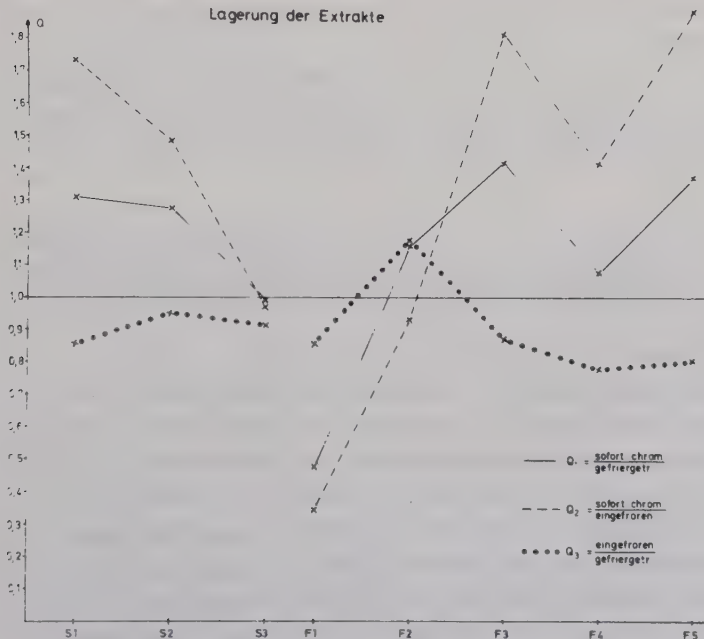


Abb. 19: Die Darstellung der Quotienten aus Tabelle 10.

den Variationen II und III. Besonders deutlich ist dieser Befund für das Verhältnis Q 2 ausgeprägt. Es liegt hier eine Differenz von 73,4 % zugunsten der sofortigen Aufarbeitung vor. Der Quotient Q 1 weist einen Unterschied von 31,2 % auf. Für die Mengen S 2 ist dieser Effekt etwas kleiner, die Mengen S 3 unterscheiden sich nicht mehr wesentlich voneinander.

Diese Verschiebung von uv-absorbierendem Material aus dem Nukleotidpool zu den Fraktionen F 1 und F 2 läßt darauf schließen, daß sowohl durch den Gefriertrocknungsvorgang als auch durch das Einfrieren der Extrakte Phosphatester abgebaut werden. Die in Abb. 19 dargestellten Quotienten der einzelnen Fraktionen zeigen deutlich, daß die Abbauprodukte Überwiegend in der Fraktion F 1, als Basen und Nukleoside, erscheinen. Es ist bemerkenswert, daß die Mono- und Triphosphate in stärkerem Maße hydrolysieren als die an sich labileren Diphosphatderivate. Der direkte Vergleich von Variation II mit Variation III stellt deutlich die Gefriertrocknung als schonenderes Verfahren heraus.

8.3. Der Einfluß von Extraktions- und Neutralisationsbedingungen auf die Extraktzusammensetzung.

Versuchsbeschreibung:

Die Störmöglichkeiten von Seiten der Hefeinkubation sowie der Ernte- und Lagerungsbedingungen wurden für diese Untersuchungen durch Verwendung von "roher" Hefe eliminiert. Aus einem handelsüblichen 500 g schweren Hefeblock wurden 16 Proben von je 250 mg genau ausgewogen. Diese Hefezellen extrahierten wir verschiedenartig (s. u.) mit 0,6 N Perchlorsäure. Die Neutralisation der Hefezell-extrakte wurde, ohne die extrahierte Hefe zuvor vom

Extrakt zu trennen, nach verschiedenen Gesichtspunkten variiert. Nach diesem Vorgang trennten wir die Hefezellen zusammen mit dem gefällten Kaliumperchlorat von dem Extrakt ab und gefriertrockneten die neutralen Lösungen.

Es wurden in diesem Versuch die Störgrößen, Extraktionszeit und Extraktionsvolumen sowie der pH-Wert und die Temperatur während des Neutralisationsvorganges, in verschiedenen Variationen untersucht. Die im Folgetext beschriebenen 8 Variationsmöglichkeiten kombinierten wir nach dem unten skizzierten Schema. Die Extraktionsbedingungen sind mit großen lateinischen Buchstaben, die Neutralisationsvarianten mit arabischen Ziffern symbolisiert.

1. Extraktionsbedingungen:

- a) Extraktionszeit: Es wurden 8 Proben 15 min und 8 Proben 60 min bei 2° C extrahiert.
- b) Extraktionsvolumen: 8 Proben wurden mit 10 ml, die restlichen 8 mit 50 ml 0,6 N Perchlorsäure extrahiert.

2. Neutralisationsbedingungen:

- a) Der pH-Wert: Die eine Hälfte der 16 Proben wurde sehr sorgfältig mit KOH auf pH 7,0 eingestellt. Es wurde dabei nicht übertitriert. Die zweite Hälfte stellten wir auf pH 12 ein, rührten 30 sec lang bei diesem pH-Wert und neutralisierten dann wieder mit Perchlorsäure. Es wurde unter Eiskühlung gearbeitet.
- b) Die Temperatur: Nach der Neutralisation blieben 8 Proben vor der Gefriertrocknung 10 min lang bei Zimmertemperatur stehen. In dieser Zeit erwärmten sie sich auf etwa 10° C. Die anderen 8 Proben wurden sofort auf -80° C abgekühlt und gefriertrocknet.

Das Kombinationsschema:

	10 ml 15 min	10 ml 60 min	50 ml 15 min	50 ml 60 min
pH 7 20°C	A 1	B 1	C 1	D 1
pH 7 10°C	A 2	B 2	C 2	D 2
pH 12 20°C	A 3	B 3	C 3	D 3
pH 12 10°C	A 4	B 4	C 4	D 4



Abb. 20: Das Chromatogramm einer Hefeprobe (C 1), die mit 50 ml 0,6 N Perchlorsäure extrahiert wurde.

Ergebnisse und Diskussion:

Die nach säulenchromatographischer Analyse und planimetrischer Auswertung ermittelten Werte sind der Tab. 11 zu entnehmen. Die Tab. 12 enthält die prozentuale Ver-

teilung der Extraktfraktionen bezogen auf die Summen S 1, S 2 und S 3. In diesen Tabellen sind schon bei oberflächlicher Betrachtung auffällige Übereinstimmungen der Ergebnisse bei bestimmter Arbeitsweise festzustellen. So weichen beispielsweise die Zahlen der Monophosphatfraktion bei allen mit A und B bezeichneten Proben deutlich von den C- und D-Werten ab. Zur genauen Analyse möglicher, weniger augenfälliger Koinzidenzen wurde folgendes Auswertungsverfahren angewendet:

Die vier zu untersuchenden Störgrößen, Extraktionszeit, Extraktionsvolumen, pH-Wert und Temperatur sind in allen 16 Analysen enthalten. Je acht Proben vertreten dabei den unteren bzw. oberen Extremwert. Es wurden daher die Mittelwerte und Quotienten Q 1 für diese Parameter aus je acht entsprechenden Einzelergebnissen errechnet. Diese acht Proben, die alle den zu analysierenden Parameter gemeinsam haben, sind jedoch nicht einheitlich. Jeweils vier dieser Gruppe enthalten nochmals den Extremwert einer zweiten Störgröße. Um die Möglichkeit, daß diese zweite Störgröße mit einem der zu untersuchenden Störgröße entgegengesetzten Einfluß den Effekt der ersten aufhebt, zu vermeiden, wurden zusätzlich die Mittelwerte und Quotienten Q 2 und Q 3 aus den entsprechenden Vierergruppen ermittelt. In den Tabellen und Diagrammen ist für die Quotienten Q 2 und Q 3 der unterscheidende Parameter angegeben. An einem Beispiel soll das Auswertungsverfahren noch einmal erläutert werden (vgl. hierzu oben stehendes Kombinationsschema).

Gefragt ist in unserem Beispiel der Einfluß des Extraktionsvolumens. Die mit A und B gekennzeichneten Proben wurden alle mit 10 ml extrahiert. Für die mit C und D markierten Proben betrug die Extraktmenge 50 ml. Es wurden also die Proben A + B und C + D gemittelt und nach

Tabelle 11: Die absoluten Werte der einzelnen Fraktionen und Summen in planimetrischen Einheiten (mg Papiergewicht).

	F1	F2	F3	NADP P9	F4	F5	Peak 19	Gesamt- summe	S1	S2	S3
A 1	289,4	96,0	112,2	7,1	94,2	258,2	-,-	857,1	464,6	560,6	857,1
A 2	285,4	90,0	117,9	6,5	93,4	287,0	-,-	880,2	498,3	588,3	880,2
A 3	320,6	209,0	161,7	8,6	144,0	457,3	12,5	1313,7	763,0	972,0	1301,2
A 4	324,0	164,6	164,7	7,0	160,0	461,8	135,5	1417,6	786,5	950,9	1282,1
B 1	313,5	171,3	116,7	8,0	127,8	363,4	-,-	1100,7	607,9	779,2	1100,7
B 2	406,7	143,8	124,4	8,3	123,7	265,3	-,-	1072,2	513,4	657,2	1072,2
B 3	404,6	173,1	146,0	9,0	192,3	423,3	80,8	1428,3	761,6	934,7	1348,3
B 4	241,4	205,0	140,2	9,7	141,5	413,1	80,5	1231,4	694,8	899,8	1150,9
C 1	399,0	119,1	45,2	5,0	71,3	199,0	-,-	838,6	315,5	434,6	838,6
C 2	395,0	90,1	28,9	4,8	89,0	325,0	-,-	932,8	442,9	533,0	932,8
C 3	526,8	117,3	37,8	4,8	119,1	340,1	97,5	1243,4	497,0	614,3	1145,9
C 4	607,0	159,2	45,4	5,0	144,5	381,4	174,0	1516,5	571,3	730,5	1369,5
D 1	550,4	117,4	47,5	9,7	116,4	379,3	-,-	1220,7	543,2	660,6	1220,7
D 2	387,0	97,3	20,9	6,5	149,6	410,0	-,-	1071,3	580,5	677,8	1071,3
D 3	658,0	70,8	52,9	7,5	139,4	475,8	200,0	1604,4	668,1	738,9	1404,4
D 4	543,5	67,0	32,5	8,0	167,0	540,0	782,7	2140,7	739,5	806,5	1358,0
Anhang: zu Abschnitt 8.4.											
A 1	684,4	656,4	485,9	-,-	378,5	442,8	-,-	2638,0	1307,2	1963,6	2638,0
A 2	632,1	484,9	456,9	-,-	367,1	448,0	-,-	2389,0	1272,0	1756,9	2389,0
B 1	814,5	697,3	416,4	-,-	398,7	527,5	413,0	3267,4	1342,6	2039,9	2854,4
B 2	881,5	550,9	331,2	-,-	402,2	494,0	-,-	2459,8	1227,4	1778,3	2459,8

Tabelle 12: Die prozentuale Verteilung der entsprechenden Fraktionen bezogen auf die Summen S 1, S 2 und S 3.

	% M	S 1 % D	% T	% Oligo	S 2 % M	% D	% T	% Vorp.% Oligo	S 3 % M	% D	% T	
A 1	24,1	20,3	55,6	17,1	20,0	16,8	46,1	33,8	11,2	13,1	11,0	30,1
A 2	23,7	18,7	57,6	15,3	20,0	15,9	48,8	32,4	11,2	13,4	10,6	32,6
A 3	21,2	18,9	59,9	21,5	16,6	14,8	47,1	24,6	16,0	12,4	11,1	35,1
A 4	20,9	20,3	58,8	17,3	17,3	16,8	48,6	25,3	12,8	12,8	12,5	36,0
B 1	19,2	21,0	59,8	22,0	15,0	16,4	46,6	28,5	15,6	10,6	11,6	33,0
B 2	19,2	24,1	51,7	21,9	18,9	18,8	40,4	37,9	13,4	11,6	11,5	24,7
B 3	24,2	25,2	55,6	18,5	15,6	20,6	45,3	30,0	12,8	10,8	14,3	31,4
B 4	20,2	20,4	59,8	22,8	15,5	15,7	45,9	21,0	17,8	12,2	12,3	35,9
C 1	14,3	22,6	63,1	27,4	10,4	16,4	45,8	47,6	14,2	5,4	8,5	23,7
C 2	6,5	20,1	73,4	16,9	5,4	16,7	61,0	42,3	9,7	3,1	9,5	29,7
C 3	7,6	24,0	68,4	19,1	6,2	19,4	55,4	46,0	10,2	3,3	10,4	27,8
C 4	7,9	25,3	66,8	21,8	6,2	19,8	52,2	44,3	11,6	3,3	9,5	31,1
D 1	8,7	21,4	69,9	17,8	7,2	17,6	57,4	45,1	9,6	3,9	14,0	38,3
D 2	3,6	25,8	70,6	14,4	3,1	22,1	60,4	36,1	9,1	2,0	9,9	33,9
D 3	7,9	20,9	71,2	9,6	7,2	18,9	64,4	46,9	5,0	3,8	12,3	39,8
D 4	4,4	22,6	73,0	8,3	4,0	20,7	67,0	40,0	4,9	2,4		
Anhang: zu Abschnitt 8,4.												
A 1	37,2	29,0	33,9	33,4	24,7	19,3	22,6	25,9	24,9	18,4	14,3	16,8
A 2	36,0	29,0	35,2	27,6	26,0	21,0	25,5	26,5	20,3	19,1	15,4	18,8
B 1	31,0	30,0	39,3	34,2	20,4	19,5	26,0	28,5	24,4	14,6	14,0	18,5
B 2	27,0	33,0	40,3	31,0	18,6	22,6	27,8	27,7	22,4	13,5	16,4	20,1

Tabelle 13: Die Berechnung der Quotienten Q_1 , Q_2 und Q_3 für die Extraktionsparameter.

Z E I T

	60 min	15 min	Q_1	60 min	10 ml 15 min	Q_2	60 min	50 ml 15 min	Q_3
Vorpeak	438,2	393,5	= 1,114	341,6	304,6	= 1,120	334,7	482,0	= 1,109
Oligo	130,7	130,6	= 1,001	173,3	139,9	= 1,239	88,1	121,4	= 0,726
Mono	85,2	89,2	= 0,955	131,8	139,1	= 0,948	38,5	39,3	= 0,980
Di	144,6	114,5	= 1,263	146,4	122,9	= 1,191	143,1	106,0	= 1,350
Tri	407,7	338,8	= 1,203	364,0	366,1	= 0,994	451,3	311,4	= 1,449
S 1	638,6	542,4	= 1,177	644,4	628,1	= 1,026	632,8	456,7	= 1,386
S 2	769,4	673,0	= 1,143	817,7	768,0	= 1,065	721,0	578,1	= 1,247
S 3	1215,8	1075,9	= 1,130	1168,0	1080,1	= 1,080	1263,6	1071,7	= 1,179

V O L U M E N

	50 ml	10 ml	Q_1	50 ml	15 min 10 ml	Q_2	50 ml	60 min 10 ml	Q_3
Vorpeak	508,4	323,3	= 1,573	882,0	304,9	= 1,581	534,7	341,6	= 1,565
Oligo	104,8	156,6	= 0,669	121,4	139,9	= 0,898	88,1	173,3	= 0,508
Mono	38,9	135,5	= 0,287	39,3	139,1	= 0,283	38,5	131,8	= 0,292
Di	124,6	134,7	= 0,925	106,0	122,9	= 0,862	143,1	146,4	= 0,977
Tri	381,4	365,1	= 1,045	311,4	366,1	= 0,851	451,3	364,0	= 1,240
S 1	544,8	636,3	= 0,856	456,7	628,1	= 0,727	632,8	644,4	= 0,982
S 2	649,5	792,9	= 0,819	568,1	768,0	= 0,740	721,0	817,7	= 0,882
S 3	1167,7	1142,0	= 1,023	1071,7	1080,1	= 0,992	1263,6	1168,0	= 1,082

Tabelle 14: Die Berechnung der Quotienten Q_1 , Q_2 und Q_3 für die Neutralisationsparameter.

P H - W E R T

	pH 7	:	pH 12	=	Q_1	pH 7	20°C	:	pH 12	=	Q_2	pH 7	100°C	:	pH 12	=	Q_3
Vorpeak	378,3	:	453,3	=	0,835	388,1	:	477,5	=	0,813	368,5	:	429,0	=	0,859		
Oligo	115,7	:	145,8	=	0,794	126,0	:	142,6	=	0,884	105,3	:	149,0	=	0,707		
Mono	76,7	:	97,7	=	0,785	80,4	:	99,6	=	0,807	73,0	:	95,7	=	0,763		
Di	108,2	:	151,0	=	0,716	102,4	:	148,7	=	0,689	113,9	:	153,3	=	0,743		
Tri	310,9	:	436,6	=	0,712	300,0	:	424,1	=	0,707	321,8	:	449,1	=	0,717		
S 1	495,8	:	685,2	=	0,724	482,8	:	672,4	=	0,718	508,8	:	698,0	=	0,729		
S 2	611,4	:	831,0	=	0,736	608,7	:	815,0	=	0,747	614,1	:	874,0	=	0,703		
S 3	996,7	:	1295,0	=	0,770	1004,3	:	1300,0	=	0,773	989,1	:	1290,1	=	0,767		

T E M P E R A T U R

	10°C	:	20°C	=	Q_1	10°C	pH 7	:	20°C	=	Q_2	10°C	pH 12	:	20°C	=	Q_3
Vorpeak	398,8	:	432,8	=	0,921	388,1	:	368,5	=	1,053	429,0	:	477,5	=	0,898		
Oligo	127,2	:	134,3	=	0,947	126,0	:	105,3	=	1,197	149,0	:	142,6	=	1,045		
Mono	84,4	:	90,0	=	0,938	80,4	:	73,0	=	1,101	95,7	:	99,6	=	0,961		
Di	133,6	:	125,6	=	1,064	102,4	:	113,9	=	0,899	153,3	:	148,7	=	1,013		
Tri	385,5	:	362,1	=	1,045	300,0	:	321,8	=	0,932	449,1	:	424,1	=	1,059		
S 1	603,4	:	577,6	=	1,045	508,8	:	482,8	=	1,054	698,0	:	672,4	=	1,038		
S 2	730,6	:	711,9	=	1,026	614,1	:	608,7	=	1,009	847,0	:	815,0	=	1,039		
S 3	1139,6	:	1152,2	=	1,011	989,1	:	1004,3	=	0,985	1290,1	:	1300,0	=	0,992		

Division von C + D durch A + B der Quotient Q 1 errechnet. Die Gruppe A + B enthält zusätzlich noch die Störgröße Extraktionszeit. Die vier Proben der Menge A wurden 15 min lang extrahiert, die der Menge B 60 min. Dies gilt in gleicher Weise für die Menge C (15 min) und D (60 min). Zur Elimination dieses Zeitfaktors wurde daher Q 2 durch einen Vergleich von Gruppe A mit Gruppe C und Q 3 von Gruppe B mit Gruppe D ermittelt.

Die Mittelwerte und die entsprechenden Quotienten sind den Tabellen 13 und 14 zu entnehmen. Die errechneten Quotienten sind in den Diagrammen 21 - 24 graphisch dargestellt.

a) Der Einfluß der Extraktionsparameter

Für den Einfluß der Extraktionszeit lassen sich aus Abb. 21 folgende Zusammenhänge ableiten: Bei der Verlängerung der Extraktionszeit von 15 min auf 60 min werden im Mittel etwa 15 % mehr an säurelöslichen Zellbestandteilen extrahiert. Dies ist auf die intensivere Zellwandschädigung und die gleichmäßigere Verteilung der Substanzen auf intra- und extrazellulären Raum zurückzuführen. Die Quotienten der einzelnen Extraktfraktionen zeigen, daß die Vergrößerung der Extraktmenge von einer vermehrten Extraktion der Vorpeak- sowie der Di- und Triphosphatfraktion herrührt. Diese Zellbestandteile scheinen sich etwas langsamer als die Fraktionen 2 und 3 mit der Extraktionsflüssigkeit ins Gleichgewicht zu setzen. Die Tatsache, daß die Fraktionen 2 und 3 durch Veränderung der Extraktionszeit kaum beeinflusst werden (vgl. Q 1), weist darauf hin, daß Hydrolysereaktionen von höhermolekularen Nukleinsäurefraktionen unter diesen Bedingungen kaum zu erwarten sind.

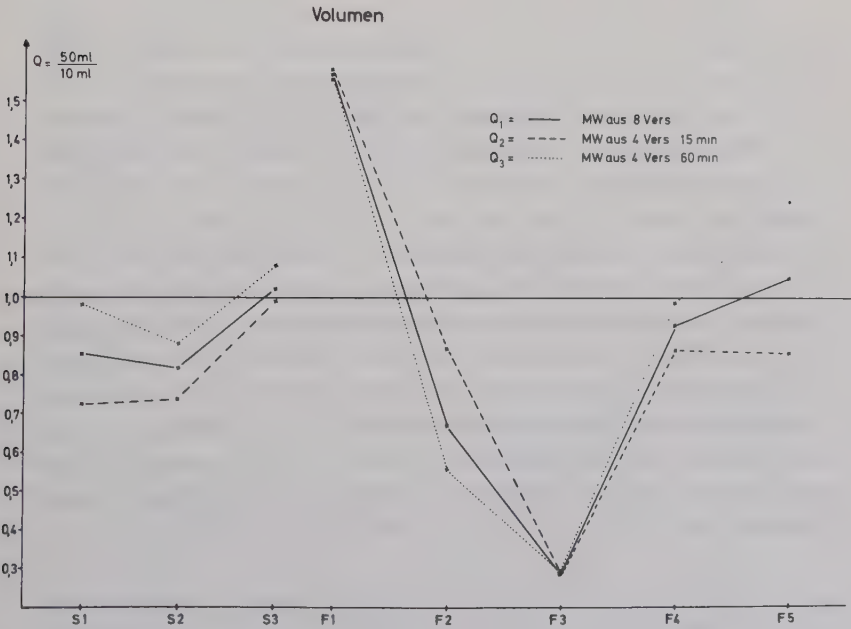
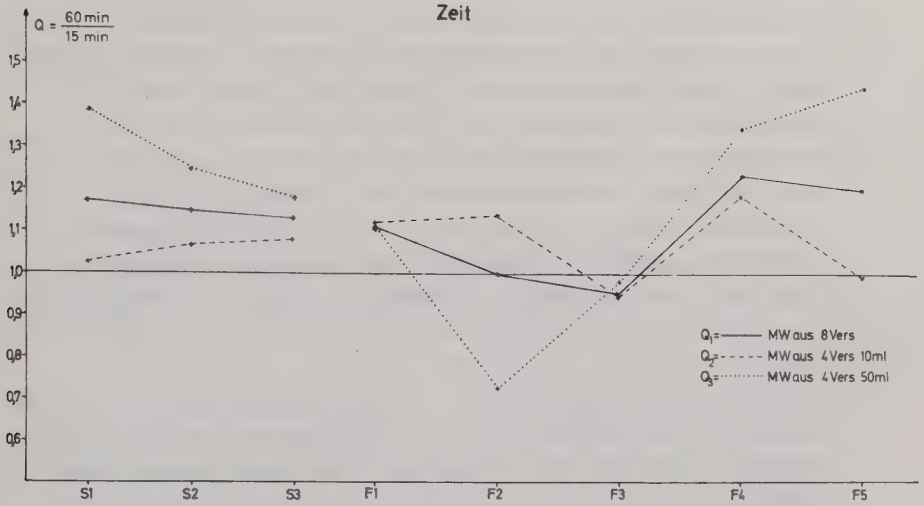


Abb. 21 und Abb. 22:

Die Darstellung der Quotienten aus Tabelle 13

Mit derartigen, hydrolysebedingten Veränderungen der Extraktzusammensetzung ist, wie gezielte Versuche zu diesem Problem ergeben haben, bei konstanter Temperatur lediglich bei Verwendung höher konzentrierter Perchlorsäure zu rechnen. PANKOTSCH, 1969, verwendete 6 N Perchlorsäure zur Extraktion der Hefezellen. Wir fanden, daß hierbei - im Vergleich zu der Extraktion mit 0,6 N Säure - die uv-absorbierenden Bestandteile 15 bis 20-fach höher im Extrakt konzentriert sind. Die Extrakte bestehen zu 95 - 97 % aus Monophosphaten, Oligonukleotiden und Vorpeakbestandteilen.

Hydrolyseerscheinungen von Di- und Triphosphatestern sind nach der Verteilung der einzelnen Fraktionen (vgl. Abb. 21) unwahrscheinlich. In einem solchen Fall wären größere Quotienten für die Fraktionen 1 und 3 und kleinere für die Fraktionen 4 und 5 zu fordern.

Das Diagramm 22 illustriert die Ergebnisse für den Einfluß des Extraktvolumens auf die extrahierbare Menge der einzelnen Fraktionen. Die Gesamtextraktmenge wird durch diesen Parameter, wie die Quotienten für S 3 zeigen, nicht wesentlich verändert. Die Summe der Phosphatderivate (S 1) ist jedoch bei einem Extraktvolumen von 10 ml größer als für das fünffache Perchlorsäurevolumen. Dieser Befund kann nicht mit einer durch Phosphatabspaltung bedingten Verschiebung von uv-absorbierenden Substanzen aus dem Nukleotidpool des Extraktes in den Basen- und Nukleosidanteil (F 1) gedeutet werden. Es ist nicht zu erwarten, daß unter unseren Bedingungen 50 ml Säure mehr Phosphatester spalten als 10 ml, die für die relativ wenigen Nukleotide einen großen Überschuß bedeuten. Die Hydrolyse der Ester ist hier vom pH-Wert abhängig und nicht vom Volumen des Reaktionsmediums.

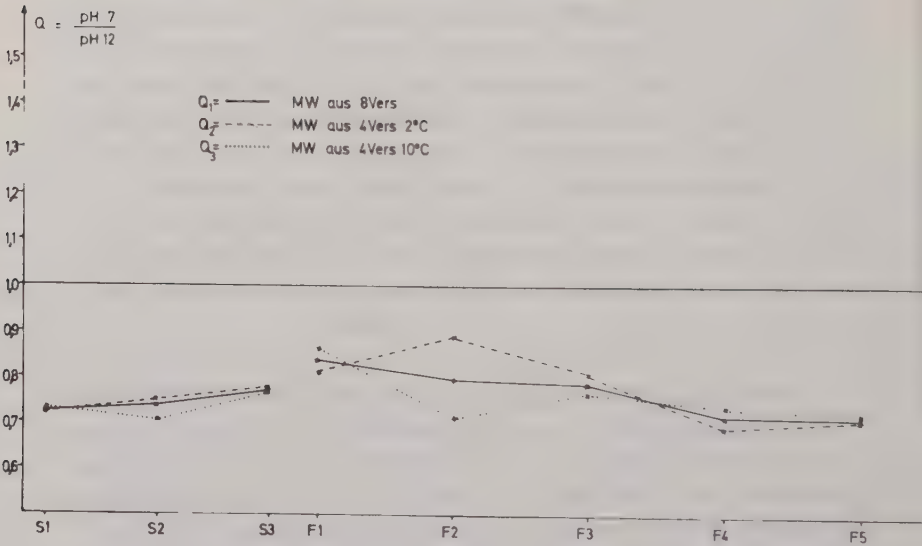
Die Aufschlüsselung der Quotienten für die fünf Extraktfraktionen zeigt, daß die Monophosphate (F 3) unter den Nukleotiden weitaus am stärksten betroffen sind (vgl. Abb. 20 und 22). Dieser Befund schließt Hydrolysereaktionen als Ursache für die ungleiche Verteilung sicher aus. Die Deutung dieser Ergebnisse mit einer Beeinträchtigung der säulenchromatographischen Trennung durch eine vergrößerte Ionenstärke - in 50 ml bleiben mehr Perchloratanionen in Lösung als in 10 ml - scheidet ebenfalls aus, da dann die vor den Monophosphaten erscheinende Fraktion F 2 weitaus stärker als diese betroffen sein müßte.

Es bleibt für die in Abb. 22 dokumentierte Verteilung daher nur folgende Erklärung. Kaliumperchlorat besitzt die Fähigkeit, Bestandteile des sauren Extraktes spezifisch zu adsorbieren. Die Monophosphatfraktion müßte dabei wesentlich stärker gebunden werden als die übrigen Bestandteile des Extraktes. Bei der Neutralisation von 50 ml Perchlorsäure fällt entsprechend mehr Perchlorat aus, so daß das Verteilungsmuster mit der hierdurch vergrößerten Adsorptionsoberfläche gut zu erklären wäre. Der folgende Versuch bestätigte die postulierte Theorie eindeutig.

Es wurden je 400 µg AMP, GMP und ATP in 10 ml Wasser aufgelöst und gut vermischt. Die eine Hälfte dieser Lösung trugen wir ohne weitere Behandlung auf die Säule auf. Die andere Hälfte vermischten wir mit einem frisch gefällten Kaliumperchloratniederschlag aus 20 ml 0,6 N Perchlorsäure und chromatographierten die Lösung nach Abtrennung des Perchlorates. Die Auswertung von drei Versuchen ergab, daß im Mittel 74,5 % AMP, 66,3 % GMP und 13 % ATP durch das Kaliumperchlorat adsorbiert werden.

Die mit 50 ml Extraktvolumen um 57 % höhere Ausbeute der Fraktion 1 (vgl. Abb. 22) ist somit auf die schlechte Löslichkeit der Basen (besonders Guanin und Adenin) in Wasser zurückzuführen.

Ph-Wert



Temperatur

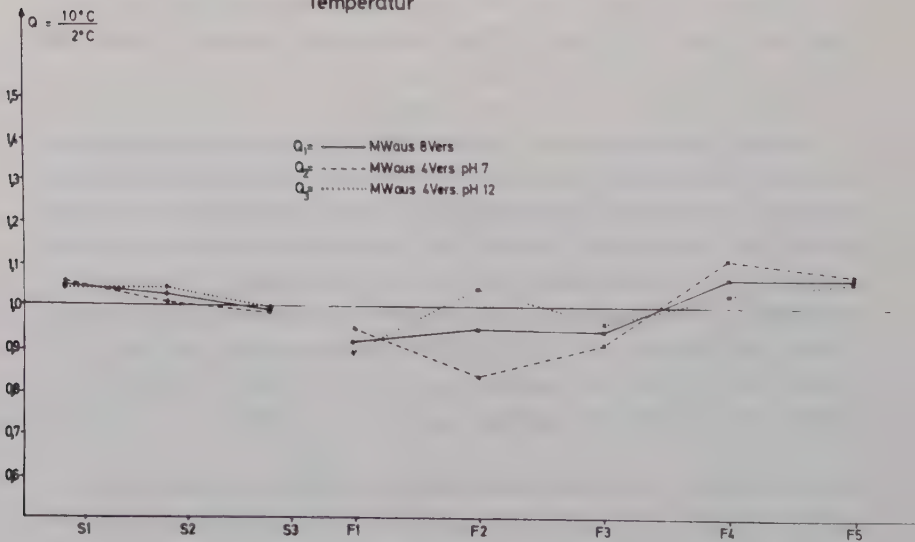


Abb. 23 und Abb. 24:

Die Darstellung der Quotienten aus Tabelle 14

b) Neutralisationsparameter.

Die Abbildung 23 beweist, daß der pH-Wert während des Neutralisationsvorganges die Extraktmenge nicht unwesentlich beeinflusst. Hat für einen relativ kurzen Zeitraum von 30 sec ein alkalischer Wert von pH 12 vorgelegen - dies kann bei Routineuntersuchungen, bei schnellem Arbeiten leicht einmal vorkommen - so wird die Menge der extrahierbaren Zellbestandteile deutlich vergrößert (vgl. S 1, S 2 und S 3). Dieser Effekt verstärkt sich, wie aus Abb. 23 hervorgeht kontinuierlich von Fraktion F 1 (+ 14,5 %) bis zur Fraktion F 5 mit einer Vergrößerung der Extraktionsmenge von 28,8 %. Dieses Ergebnis erklärt sich aus dem verbesserten Lösungsverhalten der Phosphatester und amphoteren Aminosäuren im alkalischen Milieu und einer verstärkten Schädigung der Zellwände durch Alkali. Hydrolytische Zersetzungsreaktionen sind durch das kurzfristige Ansteigen des pH-Wertes in nur geringem Umfang zu erwarten. Die Tatsache, daß sämtliche Fraktionen im gleichen Sinne beeinflusst werden, und die Beobachtung, daß die Quotienten, pH 7 dividiert durch pH 12, von Fraktion F 1 bis F 5 ständig kleiner werden, sprechen eindeutig gegen diese Möglichkeit.

Ein weiteres, wichtiges Ergebnis ist der Tabelle 11 zu entnehmen:

Der Peak 19 erscheint nur bei den mit den Ziffern 3 und 4 gekennzeichneten Proben. Er ist also nur im alkalischen Milieu extrahierbar. Dieser Befund wurde oben schon eingehend diskutiert (vgl. Abschnitt 7.6.).

Der Einfluss der Temperatur wurde in gleicher Weise wie für die anderen Störgrößen ausgewertet. Die Abb. 24 stellt die Ergebnisse graphisch dar. Eine leichte Erwärmung der neutralisierten Extrakte hat keinen wesentlichen

Einfluss auf die Extraktzusammensetzung. Ein geringer Effekt ist für die Summe S 1 vorhanden. Bei einer Temperatur von 10°C sind die Phosphatide, wie die Quotienten der Einzelfractionen zeigen, vornehmlich die Di- und Triphosphate, etwas besser extrahierbar. Da der Unterschied für die Mittelwerte aus 8 Versuchen (vgl. Q 1) maximal nur 8 % beträgt, kann dieser Feststellung jedoch keine große Bedeutung beigemessen werden. Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß bei geringfügigem Aufwärmen der Extrakte nicht mit Hydrolyseerscheinungen der Extraktbestandteile gerechnet werden muß.

8.4. Veränderungen der Extraktzusammensetzung hervorgerufen durch die Neutralisation in Gegenwart der Hefezellen.

Die im letzten Kapitel beschriebenen Veränderungen der Extraktzusammensetzung unter verschiedenen pH-Werten sind dann zu erwarten, wenn während des Neutralisationsvorganges die Hefezellen noch anwesend sind. Im folgenden Versuch sollte nun untersucht werden, ob im Vergleich zu Extrakten, die vor der Neutralisation von der Hefe getrennt wurden, größere Veränderungen der Konzentrationen einzelner Extraktbestandteile auftreten. Für einen solchen Fall wäre die Zeitersparnis bei der Präparation der Extrakte durch Auslassen eines Zentrifugierungsvorganges nicht gerechtfertigt. Ferner sollte festgestellt werden, ob der Peak 19 auch vorkommt, wenn die Extrakte in Abwesenheit der Hefezellen alkalisiert werden.

Versuchsbeschreibung:

Es wurden achtmal je 250 mg Hefe, aus dem Zentrum eines handelsüblichen 500 g-Blockes, mit je 10 ml 0,6 N Per-

chlorsäure 15 min bei 2° C extrahiert. Je zwei der Rohextrakte wurden in gleicher Weise nach folgendem Schema behandelt und anschließend säulenchromatographisch fraktioniert.

	pH 7	pH 12
Hefe nicht abzentrifugiert	A 1	B 1
Hefe abzentrifugiert	A 2	B 2

Ergebnisse und Diskussion

Die bei der planimetrischen Auswertung der Überwachungs-chromatogramme ermittelten Ergebnisse sind dem Anhang der Tabellen 11 und 12 zu entnehmen. Die Unterschiede der absoluten Werte zu den Zahlen des vorigen Versuches sind durch einen anderen Maßstab der Extinktionsskala bedingt. Es sind jeweils die Mittelwerte der beiden gleichen Proben angegeben. Zur Berechnung der in Abb. 25 dargestellten Quotienten wurden die Mittelwerte von A 1 + B 1 durch die von A 2 + B 2 dividiert.

Die Extraktmenge S 3 wird um 14 % vergrößert, wenn die Neutralisation in Anwesenheit der Hefezellen vorgenommen wird. Die Summe S 1 ist mit 6 % in geringem Maße betroffen. Die Quotienten der einzelnen Fraktionen lassen erkennen, daß lediglich die Fraktionen F 1 und F 2 sowie F 3 in nennenswertem Umfang für die Vermehrung der Extraktmenge verantwortlich sind. Ein Vergleich der alkalischen mit den neutralen Extrakten (vgl. Tab. 11) bestätigt nochmal die oben beschriebenen Veränderungen. Der Peak 19 tritt aber nur bei den Proben B 1 und nicht bei

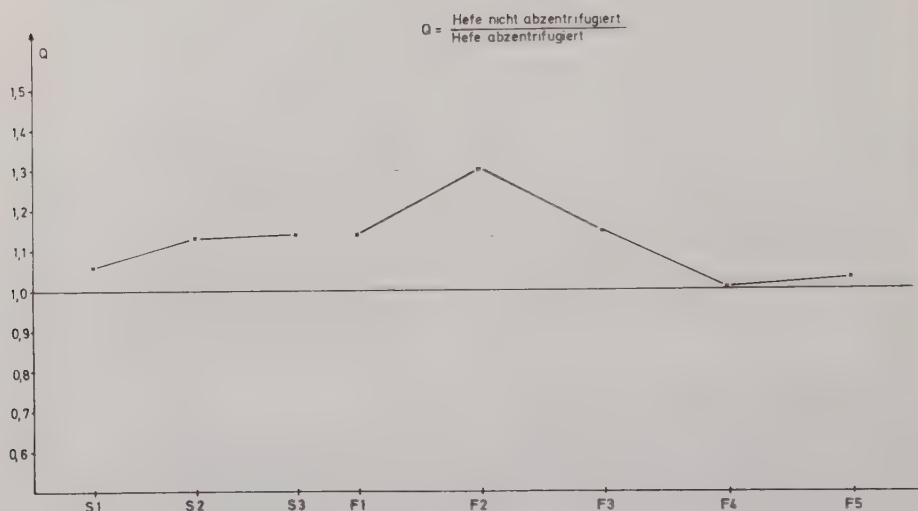


Abb. 25: Die Darstellung der aus dem Anhang der Tabelle 11 errechneten Quotienten.

den beiden Analysen B 2 auf. Er entsteht daher nicht, wie diskutiert werden könnte, als Reaktionsprodukt der übrigen Extraktbestandteile unter alkalischen Bedingungen, sondern wird bei alkalischen pH-Werten aus der Hefe extrahiert.

Unter Berücksichtigung der vermehrten Extraktion der Fraktionen F 1 - F 3 ist gegen die Anwesenheit der Hefezellen während des Neutralisationsvorganges nichts einzuwenden. Da die verbesserte Extraktion der Fraktion F 2, wie aus den Überwachungsspektren hervorgeht, hier fast ausschließlich zu Lasten der Hefepeaks 3 und 4 geht, kann die Anwesenheit der Hefe sogar erwünscht sein, falls auf eine bessere Extraktion von energiereichen Hexosephosphatnukleotiden Wert gelegt wird.

8.5. Die Zusammensetzung der Nachextrakte.

Viele Arbeitskreise haben es sich zur Regel gemacht, die einmal mit Perchlorsäure oder Trichloressigsäure extrahierten Zellen ein- oder mehrmals nachzuextrahieren. Sicherlich ist dieses gründliche Vorgehen damit zu erklären, daß zumindest der erste und zweite Nachextrakt noch erhebliche Absorption bei 260 nm aufweisen. Die Zusammensetzung der Nachextrakte wurde in folgenden Versuchen analysiert.

Die Untersuchungen des 1., 2. und 3. Nachextraktes mit Hilfe der Burton-Reaktion nach der oben beschriebenen (vgl. Teil A) "Kohlemethode" ergaben im Gegensatz zum Hauptextrakt keinen positiven Nachweis mehr. Dieses Ergebnis deutet schon darauf hin, daß die Zusammensetzung der Nachextrakte von der des Hauptextraktes abweicht. Zur säulenchromatographischen Analyse wurden je 250 mg Hefe, die 4 h unter Standardbedingungen gewachsen war, mit 10 ml 0,6 N Perchlorsäure extrahiert. Die Heferückstände behandelten wir noch dreimal mit je 10 ml Säure in gleicher Weise. Die Überstände wurden als erster, zweiter und dritter Nachextrakt bezeichnet.

Ergebnisse und Diskussion.

Die Auswertung der Überwachungschromatogramme lieferte folgendes Ergebnis für den ersten und zweiten Nachextrakt. Die Zahlen beziehen sich auf planimetrische Einheiten in mg Papiergewicht.

	F 1	F 2	F 3	Peak 19	F2 + F3 in %
1. Nachextr.	167	85	101	897	18
2. Nachextr.	137	-	25	535	4
3. Nachextr.	81	-	-	311	-

Die Fraktionen F 4 und F 5 waren in den Nachextrakten nicht mehr nachweisbar. Der Peak 19 machte den quantitativ größten Teil der uv-absorbierenden Bestandteile aus. Der heterogen zusammengesetzte Vorpeak ist im restlichen Extrakt am stärksten vertreten. Die Fraktionen F 2 und F 3 steuern 18 bzw. 4 % zur Gesamtab-sorption der Nachextrakte bei. Für den dritten Nachex-trakt waren nur die Fraktion F 1 und der Peak 19 nach-weisbar.

Diese Ergebnisse zeigen, daß Nachextraktionen mit den beschriebenen Extraktionsverhältnissen von den Frak-tionen F 3, F 4 und F 5, den Nukleotiden, lediglich geringe Mengen an Monophosphaten liefern. Ist die Fragestellung einer Untersuchung vor allem auf das Ver-hältnis von Di- und Triphosphatderivaten gerichtet, so kann immer auf Nachextraktionen verzichtet werden.

9. Zusammenfassung der Ergebnisse des Teiles B.

Es wurden die Möglichkeiten der Trennung von sauren Zellextrakten und Nukleotidgemischen mit verschiedenen chromatographischen Methoden diskutiert. Eigene Trenn-versuche mit papierchromatographischen und elektrophoto-

retischen Techniken ergaben unzureichende Ergebnisse für die Trennung von sauren Hefezellextrakten. Die Entwicklung einer genauen, empfindlichen und gut reproduzierbaren, säulenchromatographischen Trennmethode wurde beschrieben und die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode diskutiert. Es gelang uns, saure Hefezellextrakte in relativ kurzer Zeit in 25 Fraktionen aufzutrennen. Für über 40 Reinsubstanzen wurden die Retentionszeiten ermittelt. Wir isolierten und beschrieben eine Zellfraktion, die möglicherweise Tetra- und Pentaphosphatester von Purin- und Pyrimidinnukleotiden enthält.

Die Trennungen von nach verschiedenen Gesichtspunkten bereiteten sauren Zellextrakten lieferten wichtige Hinweise auf Veränderungen der Extraktzusammensetzung durch verschiedene präparativ bedingte Störfaktoren. Es wurden besonders solche Faktoren ausgewählt, wie sie bei Routineuntersuchungen oft modifiziert angewandt werden oder aus technischen Gründen unvermeidbar auftreten können.

1. Erntebedingungen und Aufbewahrung von Hefezellen und Extrakten.

Die Ernte der Hefezellen durch Abzentrifugieren der Hefe aus dem Nährmedium erwies sich als das Verfahren mit den geringsten artefiziellen Veränderungen der Extraktzusammensetzung. Die Varianten, "Ernte auf einem Membranfilter" und "Einfrieren mit dem Nährmedium", lieferten durch Hydrolysereaktionen höhere Konzentrationen der Monophosphat- und Oligonukleotidderivate. Alle Verfahren, die eine Zellwandschädigung nachsichziehen, verbesserten die Extraktionsbedingungen. Werden die Hefezellen mit dem

Nährmedium eingefroren, so gelangten über die hierbei stark geschädigte Zellwand über 90 % der säurelöslichen Zellbestandteile in das Nährmedium und werden mit diesem verworfen.

Auch das Einfrieren und Gefriertrocknen der Hefezellen brachten größere Extraktausbeuten. Wurden allerdings die Extrakte gefriergetrocknet oder eingefroren, so traten Abbaureaktionen der Nukleotidderivate auf. Die gefriergetrockneten Extrakte waren hiervon weniger stark betroffen als die eingefrorenen.

2. Extraktion und Neutralisation.

Eine Verlängerung der Extraktionszeit von 15 Minuten auf 60 Minuten verbesserte die Extraktion der Di- und Triphosphate sowie der Substanzen des Vorpeaks um maximal 15 %. Abbaureaktionen von hochmolekularen Nukleinsäurederivaten, wie sie bei Verwendung konzentrierter Säure auftraten, konnten hier ausgeschlossen werden. Die Vergrößerung des Extraktionsvolumens war mit einem Verlust an Nukleotiden, besonders der Monophosphate verbunden. Kaliumperchlorat hat die Eigenschaft, große Mengen dieser Extraktionsbestandteile zu adsorbieren.

Die kurzfristige Einstellung eines alkalischen pH-Wertes während des Neutralisationsvorganges hatte eine verbesserte Extraktion aller Extraktbestandteile zur Folge. Ferner trat unter diesen Bedingungen der noch nicht identifizierte Peak 19 auf. Ein Temperaturanstieg auf 10° C während und nach der Neutralisation veränderte die Extraktzusammensetzung nur unwesentlich.

Die Anwesenheit der Hefezellen während der Neutralisation erwies sich als unbedenklich. Es konnte so ein Zentrifugiertvorgang eingespart werden. Die Nachextrakte enthalten keine Di- und Triphosphatderivate.

Es kann nach diesen Ergebnissen keine für alle Fragestellungen optimale Arbeitsvorschrift empfohlen werden, da der eine oder andere hier als störend gewertete Effekt für bestimmte Probleme durchaus erwünscht sein kann. Die Ergebnisse untermauern die Forderung, daß nur die mit der gleichen Methode erzielten Werte zu vergleichen sind. Wie sehr dabei auf scheinbar banale Kleinigkeiten geachtet werden muß, wird durch diese Untersuchungen deutlich hervorgehoben.

TEIL C

10. Untersuchung der säurelöslichen Hefezellextrakte in Abhängigkeit von Wachstum und Vermehrung.

10.1. Die Einwirkung verschiedener Wachstumsbedingungen auf die Synthese von DNS, RNS und der säurelös- lichen, uv-absorbierenden Zellbestandteile.

In diesem Abschnitt werden die Auswirkungen von Konzentrationsveränderungen der Hefezellsuspension, verschiedener Nährstoffzusätze und der Einzelbestandteile des Vitamingemisches auf die Synthese von RNS, DNS und der säurelöslichen Zellbestandteile beschrieben. Zum Teil sind diese Untersuchungen - meist als Nebenfunde - schon von mehreren Autoren vorgenommen worden (vgl. ARNOLD, 1963, HAERTEL, 1971, LANGBEHN, 1972, PANKOTSCH, 1969, STOSSEK, 1966, und WORTBERG, 1968). Da diese Ergebnisse jedoch wegen unterschiedlicher Fragestellungen mit den verschiedensten Methoden ermittelt wurden, sollen die genannten Parameter noch einmal mit einer standardisierten Analytik zusammengefaßt untersucht werden.

Experimentelles:

Die synchronisierten Hefezellen werden - abgesehen von den im einzelnen zu untersuchenden Varianten - unter Standardbedingungen im modifizierten Nährmedium nach WILLIAMSON inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Je nach Wachstumszustand wurden dabei Hefefeuchtgewichte von 50 - 250 mg ermittelt. Wie unter "Material und Methoden" beschrieben, bestimmten wir die Extinktion der säurelöslichen Extrakte bei 260 nm und den Gehalt an DNS und RNS.

10.1.1. Unterschiedliche Ausgangskonzentration der Hefe im Nährmedium.

Es wurden Ausgangskonzentrationen der Hefe von 0,1 %, 0,66 % , 1,72 % und 5 % gewählt und miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Abb. 26 A-C dargestellt. Das Verhalten der säurelöslichen Zellbestandteile (Abb. 26 C), enthaltend Vorstufen der Nukleinsäure- und Proteinsynthese sowie Nukleotide des Energiehaushaltes, zeigt eine fast proportionale Abhängigkeit von der Hefekonzentration. Bei einer 0,1 %-igen Ausgangskonzentration wird nach der Nährstoffzugabe in nicht ganz 3 h die Ausgangsmenge dieser Zellfraktion auf fünf-fach höhere Werte angehoben. Etwa 15 Minuten vor Einsetzen der DNS-Reduplikation wird der Anstieg dieser Zellbestandteile gedrosselt, so daß eine kleine Stufe entsteht. Da die säurelöslichen Extrakte einen hohen Anteil an Substanzen enthalten, die dem Energiehaushalt der Zelle angehören (u. a. ATP, GTP, ITP), kann vermutet werden, daß allgemeine, energieliefernde und vor allem wachstumsbezogene Stoffwechselwege zugunsten der DNS-Synthese gebremst werden. Etwa 30 Minuten vor Beginn der S-Phase ist auch eine Reduzierung der RNS-Synthese festzustellen (vgl. Abb. 26 A und B). Die 0,66 %-ige Ausgangskonzentration bewirkt eine deutlich geringere Syntheserate der säurelöslichen Zellbestandteile. Wird die Hefekonzentration zu Beginn des Versuches auf 1,72 % erhöht, so fallen die Werte dieser Fraktion nach einem anfänglichen Anstieg schon bald wieder ab, während eine 5 %-ige Suspension keine Neusynthese mehr zuläßt.

Diese Beobachtungen gelten in ähnlicher Weise auch für die DNS- und RNS-Synthese. Die Konzentration an RNS verhält sich genau wie die der säurelöslichen Zellbestandteile. Die DNS wird allerdings allein bei den beiden niedrigen Hefe-

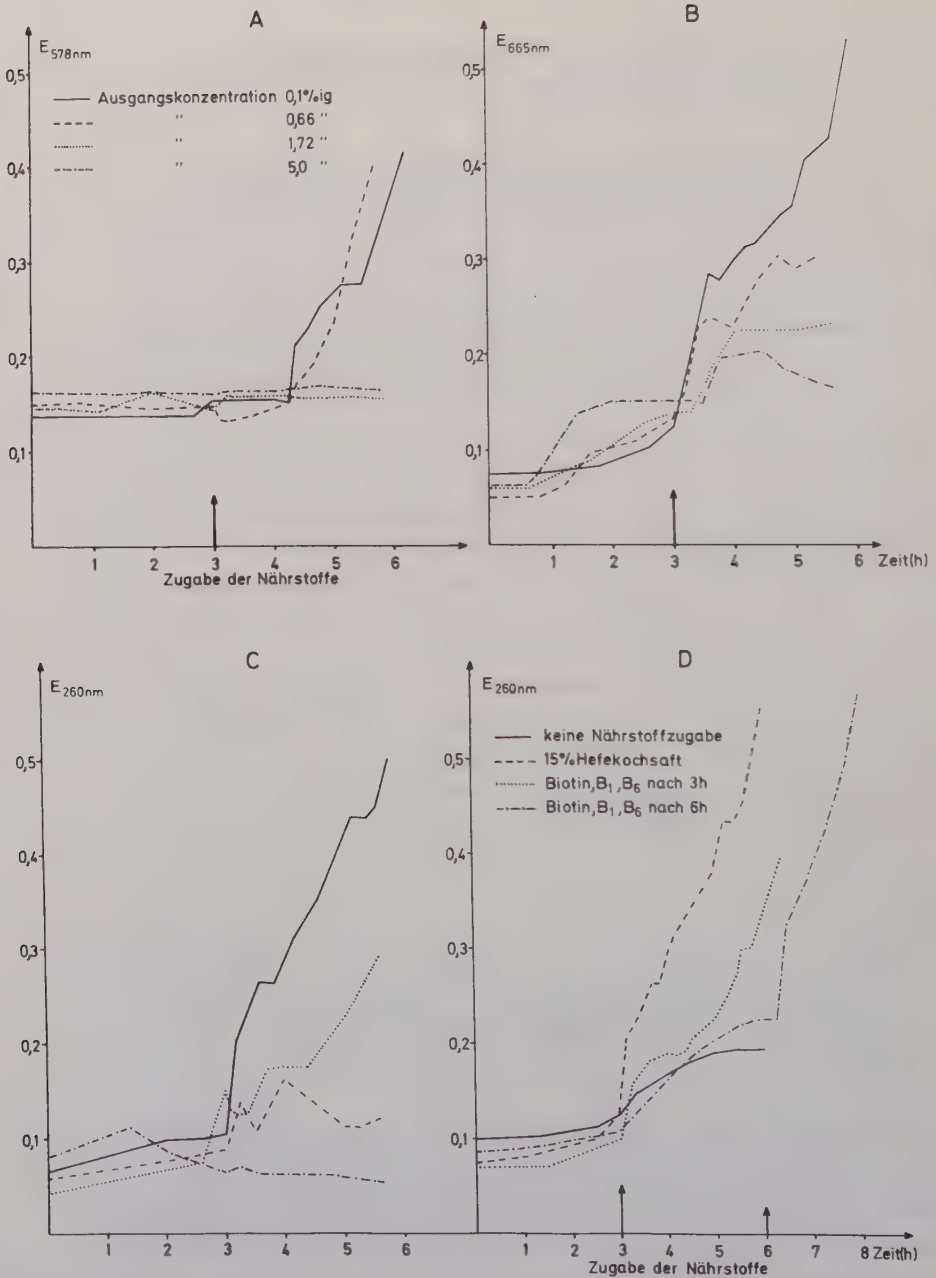


Abb. 26: Das Verhalten von säurelöslichen Zellbestandteilen, der DNS und RNS bei verschiedenen Wachstumsbedingungen.

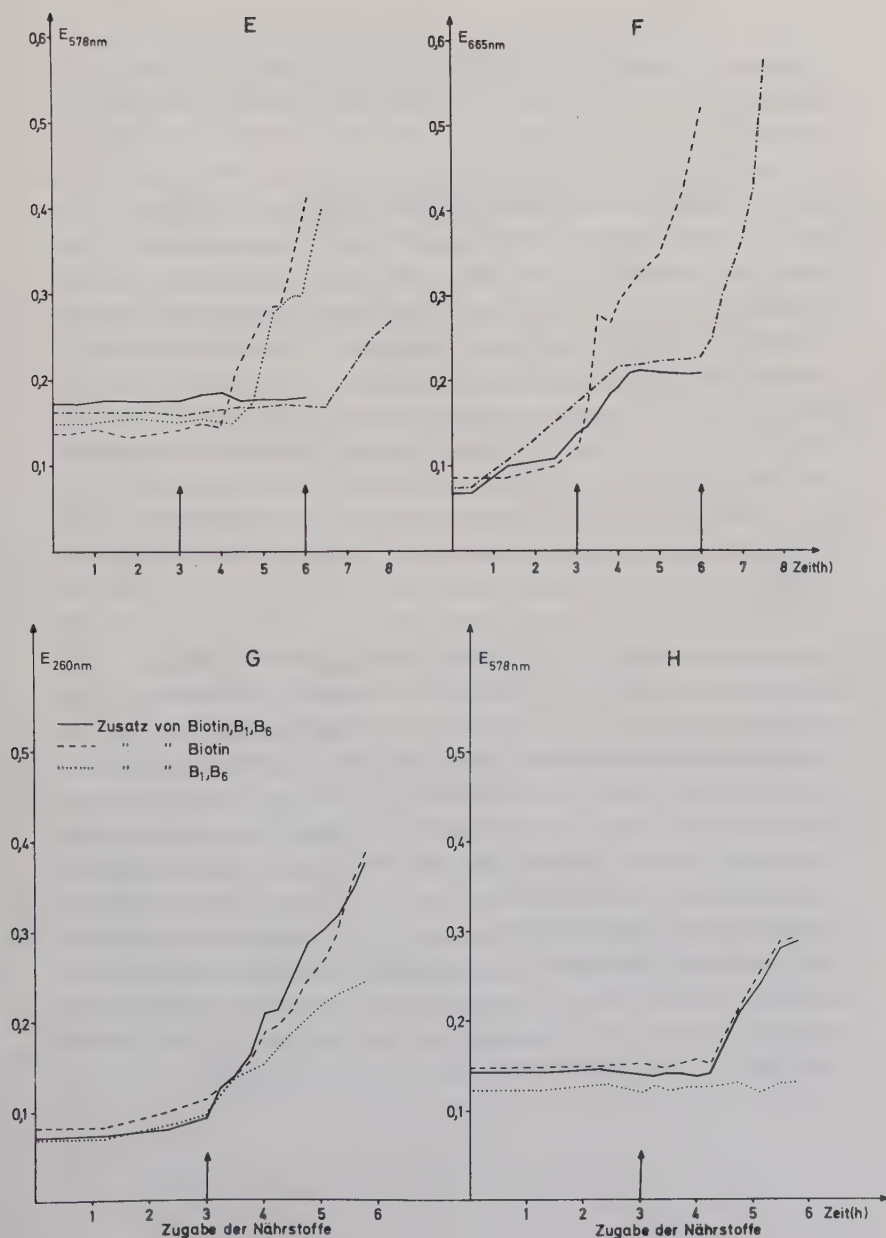


Abb. 26: C, D und E = säurelösliche Zellbestandteile,
A, E und H = DNS, B und F = RNS.

konzentrationen in kaum unterscheidbarer Geschwindigkeit verdoppelt. Schon die 1,72 %-ige Ausgangskonzentration der Hefesuspension unterbindet die DNS-Neusynthese vollständig.

Die Ursachen für die geschilderten Befunde sind einmal dem bei höherer Konzentration der Hefe auftretenden Mangel an Sauerstoff und Nährsubstraten anzulasten, zum anderen aber auch in der hierdurch bedingten Umschaltung auf anaeroben Stoffwechsel zu suchen. Die Anhäufung von Metaboliten und vor allem der durch die Gärungsprozesse bedingte Abfall des pH-Wertes müssen zusätzlich berücksichtigt werden. Nach mehreren Stunden Wachstumszeit kann die Wasserstoffionenkonzentration des Nährmediums auf Werte zwischen pH 2,6 und 2,8 abfallen (vgl. STOSSEK, 1966). Hierdurch werden ohne Zweifel eine Vielzahl von Enzymreaktionen in ihrer Geschwindigkeit stark beeinträchtigt.

Diese Enzymhemmung und die gedrosselte Produktion an Protein- und Nukleinsäurebausteinen sowie der energiereichen Phosphate sind wohl für das Ausbleiben der DNS-Reduplikation verantwortlich zu machen. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß zwischen der 0,1 %-igen und 0,66 %-igen Ausgangskonzentration der Hefesuspension kein Unterschied in der Geschwindigkeit und dem Ausmaß der DNS-Synthese nachweisbar ist, obwohl die 0,1 %-ige Konzentration die Produktion von fast doppelt soviel säurelöslichen Zellbestandteilen zuläßt. Die DNS-Synthese benötigt offenbar eine gewisse Mindestmenge und sicher auch eine abgestimmte Zusammensetzung der säurelöslichen Zellbestandteile. Ist dies nicht gewährleistet, so wird keine DNS synthetisiert.

10.1.2. Variationen der Nährstoffzugabe.

Die Abweichungen von den Standardversuchsbedingungen sowie die Ergebnisse der Versuche sind den Diagrammen 26 D, E, und F zu entnehmen. Der Zusatz der Wachstumsstoffe bewirkt einen prompten Anstieg der Syntheseraten von säurelöslichen Bestandteilen und RNS. Hefekochsaft verstärkt diesen Effekt deutlich gegenüber dem verwendeten Vitamingemisch. Bleibt die Wachstumsstoffzugabe aus, so bleibt nach einem leichten Anstieg die Synthese dieser Stoffe stehen. Die Zellen nehmen nur noch wenig an Gewicht zu. Die Stimulation des Stoffwechsels durch die Wachstumsstoffzugabe ermöglicht den Übergang der Zellen in die S-Phase.

Die DNS-Synthese setzt bei der Verwendung von Hefekochsaft nach 60 Minuten bei dem etwas schwächer wirkenden Vitamingemisch nach 80 Minuten aber mit gleicher Geschwindigkeit ein. Verzögert man die Wachstumsstoffzugabe bis 6 Stunden nach Versuchsbeginn, so beginnt dieser Syntheseschritt wesentlich früher, nämlich schon 30 Minuten danach, obwohl die Synthese der säurelöslichen Zellbestandteile und der RNS zwischen der vierten und sechsten Stunde völlig zum Erliegen gekommen war (vgl. Abb. 26 D - F). Dieser Befund veranschaulicht die unten diskutierte Bedeutung des Vitamingemisches, speziell des Biotins, für Wachstum und Vermehrung. Im vorliegenden Fall kommen die Wachstumsvorgänge durch das Ausbleiben der Vitaminzugabe zum Stillstand. Wenn aber hierauf das Gemisch nach 6 Stunden zugesetzt wird, setzt die DNS-Synthese wesentlich früher ein als wenn der Zusatz nach 3 Stunden erfolgt.

10.1.3. Der Einfluß der einzelnen Vitamine.

Die Wirkung des Vitamingemisches wurde beschrieben. Es interessiert nun, welchen Beitrag die Einzelkomponenten dieses Gemisches für das Zustandekommen seiner Wirkungen leisten. Hierzu wurden Wachstumsversuche durchgeführt, bei denen 3 Stunden nach Versuchsbeginn lediglich die möglichen Kombinationen von je zwei Vitaminen, später auch die einzelnen Vitamine allein und zum Vergleich das vollständige Gemisch zugesetzt wurden.

Die Abbildungen 26 G und H illustrieren repräsentativ die Ergebnisse dieser Versuche an Hand von drei Varianten. Die Übrigen, nicht dargestellten Modifikationen bieten entsprechende Verläufe. Die Abbildung 26 H zeigt, daß die Reduplikation der DNS nur in Gegenwart von Biotin möglich ist. Die Kombination der Vitamine B₁ und B₆ bewirken nicht den Übergang der Zellen in die S-Phase, obwohl die Synthese der säurelöslichen Zellbestandteile und der RNS - hier nicht dargestellt -, allerdings in geringfügig verminderter Intensität, aufrecht erhalten werden.

Ein Vergleich mit den Abbildungen 26 A und C beweist, daß bei dieser Syntheserate die Reduplikation der DNS durchaus möglich wäre. Es ist daher zu fragen, inwieweit Biotin die Zusammensetzung der säurelöslichen Zellbestandteile beeinflusst oder ein direkter Eingriff der Substanz in den Regulationsvorgang der DNS-Synthese diskutiert werden kann.

10.2. Die Fraktionierung der in Abhängigkeit von Wachstum und Vermehrung gewonnenen, säurelöslichen Extrakte mit Hilfe der PEI-Zellulosesäule.

Um das quantitative Verhalten der Extraktfraktionen besser beurteilen zu können, wurden drei größere Versuche, nach verschiedenen Gesichtspunkten modifiziert, durchgeführt. Zu den in den Tabellen 15 - 17 angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils zwei Hefeproben geerntet und säulenchromatographisch aufgearbeitet. Die Markierung der Pyrimidinnukleotide mit ^3H -Uracil sollte genaueren Aufschluß über das Verhalten seiner Derivate liefern, da die photometrische Auswertung dieser Bestandteile wegen ihrer geringen Konzentration (vgl. CMP, CDP und CTP) mit größeren Analysefehlern verbunden und oft nicht möglich war.

10.2.1. Quantitative Veränderungen der Extraktzusammensetzung bei Wachstum und Vermehrung.

a) 1. Versuch:

Die synchronisierten Hefezellen wurden unter Standardbedingungen inkubiert. Nach 3 h setzten wir das Vitamingemisch zu. Die Ernte der Hefezellen erfolgte auf einem Membranfilter. Nach dem Waschen extrahierten wir die Hefe mit 10 ml 0,6 N Perchlorsäure bei 20° C. Der Extrakt wurde neutralisiert und gefriertrocknet. Jeweils zwei Proben wurden an einem Tag säulenchromatographisch aufgearbeitet. Die Absorption bei 260 nm wurde mit Hilfe der Uvicord-Registrierereinheit aufgezeichnet und die Eluate in Fraktionen von je 2,5 ml im LKB-Ultra-Rac gesammelt. Unter Berücksichtigung des Schlauchvolumens von Küvette bis Sammler poolten wir die Röhrchen der entsprechenden

Fractionen und photometrierten die Proben bei 260 nm. Durch Multiplikation des Extinktionswertes mit dem Gesamtvolumen der Probe in ml bezogen wir alle Extinktionswerte auf 1 ml Lösung. Wir verzichteten auf eine Umrechnung der Ergebnisse in Absolutwerte, da einmal nicht alle Peaks identifiziert sind und zum anderen nicht absolut sicher ist, daß die Peaks der Hefechromatogramme immer nur aus einer Substanz bestehen. Der Zellrückstand wurde zur Bestimmung des DNS-Gehaltes verwendet.

b) 2. Versuch:

Für den zweiten Versuch wurden gegenüber dem oben beschriebenen folgende Veränderungen der Aufarbeitung und Auswertung vorgenommen:

1. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation in einer Stock-Zentrifuge von dem Nährmedium abgetrennt.
2. Die Eluat-Extinktion registrierten wir mit der Zeiss-Registriereinheit und dem Polycomb-Punktdruckschreiber über einen TE-Wandler.
3. Die planimetrische Auswertung nahmen wir durch Auswiegen der auf Entwurfpapier durchgepauschten Peakprofile vor.

Die Ergebnisse sind für den ersten Versuch in Extinktionseinheiten pro Milliliter - durch Multiplikation des Peakvolumens mit dem Extinktionswert - in Tabelle 15 und für den zweiten Versuch in planimetrischen Einheiten in Tab. 16 jeweils als Mittelwerte der Doppelbestimmung angegeben. Außerdem sind diesen Tabellen in Form von Quotienten die quantitativen Verhältnisse einzelner Extraktfraktionen zueinander und die Extinktionswerte der DNS-Bestimmung zu entnehmen. Alle Ergebnisse beziehen sich auf 100 ml Erntevolumen. Ein Teil der in Tab. 16 zusammengefaßten Werte sind in Abbildung 29 dargestellt.

Tabelle 15: Die Ergebnisse von Versuch 1 angegeben in E₂₆₀ / ml. Die Extinktionseinheiten sämtlicher Peaks wurden auf 1 ml Peakvolumen und 100 ml Erntevolumen bezogen.

	180 min	Biotin- zugabe	190 min	200 min	270 min	300 min	330 min
DNS (E ₅₇₈ nm)	0,220		0,224	0,200	0,234	0,392	0,414
Vorpeak	9,04		15,47	17,42	19,47	17,68	22,15
Oligo	2,90		3,18	4,05	7,00	6,61	11,44
Peak 2	0,35		0,35	0,33	0,84	0,66	1,23
UDP-Gluc.	0,53		0,78	0,58	0,94	0,98	1,76
UMP	0,36		0,42	0,46	1,30	1,55	1,93
CMP	0,31		0,44	0,54	0,62	1,22	2,12
AMP	2,54		3,09	4,17	7,67	10,34	12,15
GMP	0,37		0,27	0,54	1,33	1,64	2,49
NADP	0,24		0,21	0,30	0,61	0,76	0,80
UDP	0,11		0,17	0,28	1,22	0,61	0,88
CDP	0,03		0,10	0,27	-,-	0,09	0,17
ADP	1,18		1,16	1,03	1,72	1,72	2,19
GDP	0,82		0,52	0,73	1,28	0,93	1,13
Peak 15	0,14		0,07	0,28	0,33	0,13	0,83
UTP	0,56		0,53	0,72	1,48	0,63	0,92
CTP	-,-		0,22	-,-	-,-	-,-	-,-
ATP	3,53		3,81	4,70	4,67	2,05	3,15
GTP	1,55		1,04	2,05	2,47	1,17	1,65
Peak 19	4,87		6,34	10,71	18,22	10,00	13,16
ATP/ADP	2,99		3,28	4,56	2,72	1,19	1,44
GTP/GDP	1,89		2,00	2,81	1,93	1,26	1,46
ATP/GTP	2,28		3,66	2,29	1,89	1,75	1,91
ADP/GDP	1,44		2,23	1,41	1,34	1,85	1,94
AMP/GMP	6,86		11,44	7,72	5,77	6,29	4,88
A/G	2,64		4,40	2,98	2,77	3,96	3,32

Tabelle 16: Die Ergebnisse von Versuch 2 angegeben in planimetrischen Einheiten pro 100 ml Erntevolumen.

	10 min	65 min	180 min	Biotin- zugabe	190 min	209 min	240 min	270 min	300 min	330 min	360 min
DNS(E _{578nm})	0,20	0,19	0,20		0,21	0,20	0,21	0,24	0,42	0,41	0,48
Vorpeak	178,8	131,1	540,7		825,6	609,9	656,6	900,8	516,6	850,0	720,5
Oligo	68,3	4,1	-		61,2	78,0	67,5	102,2	177,2	301,0	406,3
Peak 2	-	-	-		-	-	25,3	48,1	120,6	120,6	77,4
UDP-gluc.	2,4	3,0	-		46,1	15,1	8,6	10,5	19,7	23,8	30,6
UMP	4,0	3,6	-		8,0	6,7	8,7	22,3	24,1	75,2	105,8
OMP	0,9	-	-		-	-	-	-	-	-	-
AMP	23,3	6,0	-		9,0	15,5	5,0	26,8	40,4	52,2	142,6
GMP	2,1	3,2	-		4,0	10,9	2,9	15,2	20,4	5,2	32,8
NADP	14,1	5,8	-		15,9	9,0	19,7	21,2	23,0	28,4	22,8
UDP	2,6	2,8	-		9,7	4,7	10,4	21,3	8,1	14,4	23,6
CDP	-	-	-		-	-	-	7,5	6,8	2,8	20,6
ADP	26,2	18,0	-		44,1	9,9	13,0	43,0	43,6	52,8	119,6
GDP	8,3	5,6	-		5,5	7,9	4,0	15,6	14,7	12,8	29,2
Peak 15	-	-	-		-	-	-	-	9,3	8,6	-
UTP	20,7	11,8	-		31,2	17,6	30,6	36,7	59,1	21,6	55,4
CTP	3,5	3,6	-		8,5	10,3	13,6	13,2	17,3	14,6	23,2
ATP	148,4	49,5	-		209,7	127,6	154,0	190,5	242,7	218,4	321,0
GTP	34,5	14,6	-		44,0	24,2	40,8	65,3	65,8	64,8	119,6
Peak 19	-	-	-		146,0	-	-	-	117,5	89,4	951,0
ATP/ADP	5,66	2,75	-		4,75	12,89	11,84	4,43	5,57	4,14	2,68
GTP/GDP	4,16	2,61	-		8,00	3,06	10,20	4,19	4,48	5,06	4,10
ATP/GTP	4,30	3,33	-		5,27	5,27	3,77	2,92	3,69	3,37	2,68
ADP/GDP	3,15	3,21	-		8,02	1,25	3,25	2,76	2,97	4,13	4,10
AMP/GMP	11,10	1,87	-		2,25	1,42	1,72	1,76	1,98	10,03	4,34
A/G	4,41	3,14	-		4,91	3,56	3,61	2,71	3,24	3,91	3,21

Für den Versuch 2 konnten aus technischen Gründen nicht alle Fraktionen quantitativ ausgewertet werden. Bedingt durch die lineare Anordnung der Extinktionsskala ergeben geringe Mengen bzw. Konzentrationen so kleine Peaks, daß ihre genaue Auswertung Schwierigkeiten bereitete. Aus diesem Grunde sind die Ergebnisse für Cytosinderivate und einige andere kleine Fraktionen nicht in der Tab. 16 aufgeführt. Die Chromatogramme der nach 180 min geernteten Proben konnten wegen eines technischen Defektes der Registriereinheit nicht geschrieben werden.

10.2.2. Markierung der Pyrimidinderivate mit ^3H -Uracil.

Durch den Versuch sollten weitere Aufschlüsse über den Status der Pyrimidinderivate in der durch Biotinzusatz induzierten, stoffwechselaktiven Phase der Hefezellen gewonnen werden.

Dem Inkubationsansatz A setzten wir nach 3 h 50,0 μCi ^3H -Uracil pro 100,0 ml Nährmedium zu. Fünf und zehn min später wurde je eine Probe durch Zentrifugation geerntet. Hierauf wurde Biotin zugesetzt und nach je 10 min zwei weitere Proben in gleicher Weise entnommen. Die Hefe wurde mit Perchlorsäure extrahiert, die Extrakte neutralisiert, gefriergetrocknet und chromatographisch fraktioniert.

Der Ansatz B wurde 4 h unter Standardbedingungen inkubiert, bevor 50,0 μCi ^3H -Uracil pro 100,0 ml zusammen mit Biotin zugesetzt wurde. Hierauf ernteten wir zu den in Tab. 17 B angegebenen Zeitpunkten und arbeiteten die Hefe wie für Ansatz A beschrieben auf.

Je ein Milliliter der Eluatfraktionen (je 2,5 ml) wurde wie unter "Material und Methoden" beschrieben für die radiometrische Auswertung eingesetzt. Den Abb. 27, 28 und 13 sowie der Tab. 17 sind die Ergebnisse dieser Analysen zu entnehmen.

Tabelle 17: Ergebnisse der Markierungsversuche A und B in cpm/200 µl Erntevolumen.

Versuch A

	³ H-Uracil 50 µCi	5 min	10 min	Biotin- zugabe	20 min	30 min
Vorpeak		46.318	188.428		113.141	109.062
Oligonukl.		71.138	74.328		55.983	53.372
UDP-Gluc.		214.478	345.938		212.709	174.657
UMP		9.483	15.219		72.775	35.568
CMP		8.668	11.521		21.322	14.098
UDP		22.660	30.132		59.967	11.556
CDP		9.101	14.689		17.964	10.440
UTP		102.395	169.775		132.857	60.460
CTP		19.780	36.366		33.879	19.961
RNS + DNS		5.798	8.176		434.193	- - -

Versuch B

	³ H-Uracil + Biotin	5 min	12 min	20 min	60 min	100 min
Vorpeak		92.127	194.189	124.439	187.136	200.984
Oligonukl.		67.046	57.002	106.238	285.558	594.908
UDP-Gluc.		318.900	231.247	265.115	305.586	366.660
UMP		30.048	76.614	24.304	157.814	71.854
CMP					58.010	36.778
UDP		16.625	22.699	27.662	99.130	87.800
CDP		4.914	9.976	13.185	37.684	36.906
UTP		95.303	98.785	218.964	180.232	211.248
CTP		11.246	18.024		45.990	92.728
RNS + DNS		4.209	21.904	31.769	1.030.570	2.267.276

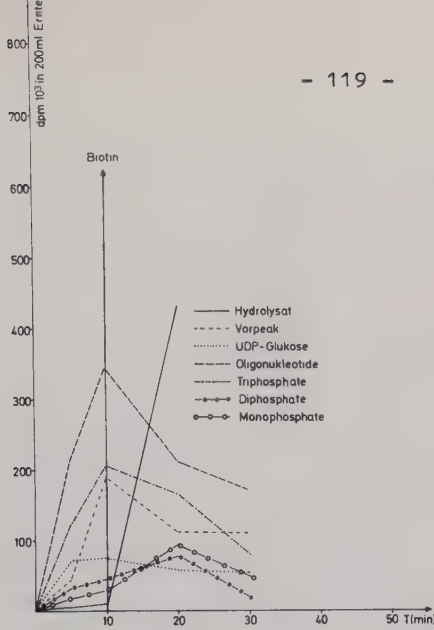
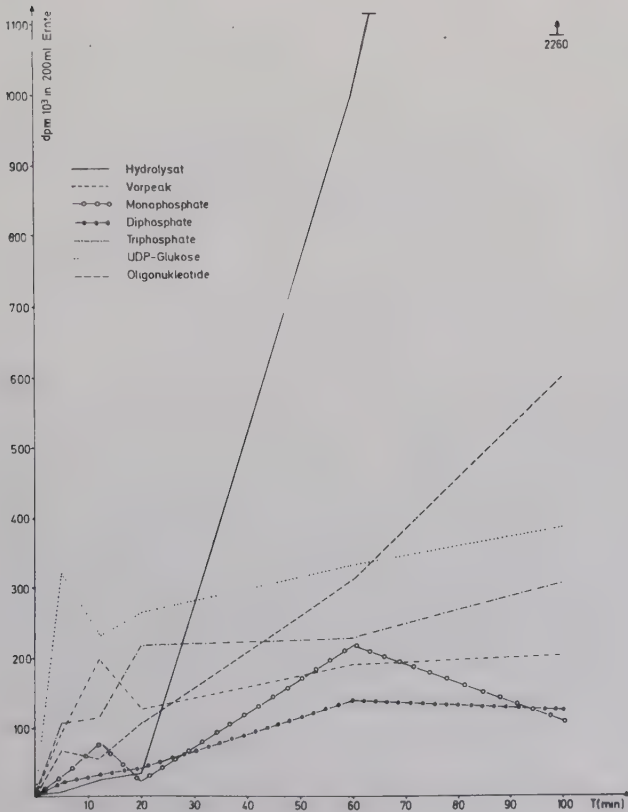


Abb. 28: Die Darstellung der Ergebnisse von Inkubationsansatz B.



10.2.3. Diskussion der Ergebnisse

Die in der Einleitung erörterte Problemstellung dieser Arbeit verlangte eine genaue Analyse der Ergebnisse für den Übergang der Hefezellen von der Lag-Phase in die durch das Vitamingemisch induzierte, stoffwechselaktive Phase (G 1 Phase) und zum Zeitpunkt der DNS-Reduplikation (S-Phase). Unmittelbar nach Zugabe des Vitamingemisches wird die Menge der Vorpeakfraktion der säurelöslichen Extrakte deutlich vergrößert, obwohl die Konzentration an markierten Pyrimidinderivaten in dieser Fraktion verkleinert wird (vgl. Tab. 15 und 16 mit Abb. 27). Diese Konstellation läßt darauf schließen, daß für die prompte Zunahme der uv-absorbierenden Substanzen im Vorpeak zunächst weniger Nukleinbasen und Nukleoside als vielmehr Aminosäuren und andere Stoffe verantwortlich sind. Die Nukleotide scheinen, wie aus Abb. 27 und 28 hervorgeht, erst 20-30 Minuten später an der Extinktionszunahme beteiligt zu sein. Einige Fraktionen werden gegenüber dem Ausgangswert vor Zugabe des Vitamingemisches geringfügig vergrößert, andere wieder etwas vermindert (s. Tab. 16 und 17). Die Nukleotide nehmen nach 10 min zunächst ab und dann wieder zu, zuerst die Di- und Triphosphate, dann auch die Monophosphate (s. Abb. 29).

Die Abb. 27 zeigt ein ähnliches Verhalten für die Markierung der Pyrimidinderivate. Die UDP-Glukose und die Triphosphate werden weniger, die Mono- und Diphosphatderivate relativ stärker markiert. Zusammengefaßt kann festgestellt werden, daß die starke Zunahme der Extinktion von säurelöslichen Hefezellextrakten sofort nach Zugabe des Vitamingemisches fast ausschließlich zu Lasten der Vorpeakfraktion geht. Hieran sind offensichtlich vor allem die Aminosäuren beteiligt.

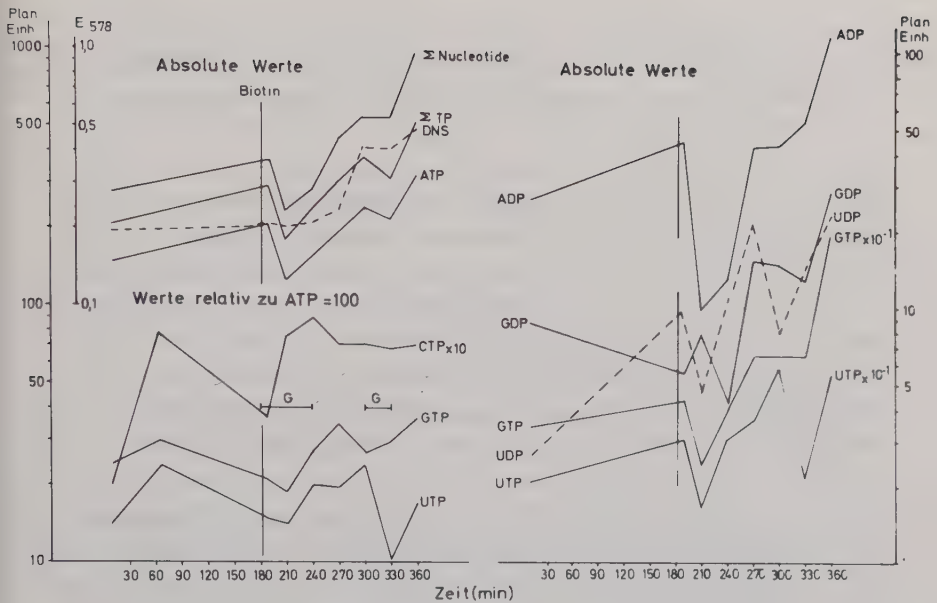


Abb. 29: Die Diagramme illustrieren einige markante Ergebnisse aus Tab. 16. Links unten sind die relativen Veränderungen von CTP, GTP und UTP zu ATP = 100 dargestellt.

1. Die stoffwechselaktive Phase.

Dieser durch die Zugabe der Wachstumsfaktoren einsetzende Anstieg der Vorpeakfraktion kann als eine durch Biotin induzierte Neusynthese von Aminosäuren und 10 - 20 Minuten später auch von Purin- und Pyrimidinbasen sowie Nukleosiden gedeutet werden. Die Interpretation der Ergebnisse wird durch die Untersuchungen von MOAT et al. gestützt. 20 - 60 Minuten nach der Zunahme dieser elementaren Bausteine setzt auch eine Vergrößerung des Phosphatesterpools ein. Diese verhältnismäßig spät einsetzende Neusynthese der Nukleotide ist auf folgende Mechanismen zurückzuführen:

Die Protein- und Enzymsynthese läuft unter Biotinmangel, durch den ein relativer Mangel an Aminosäuren, insbesondere von Asparagin, Isoleucin und Arginin, hervorgerufen wird, stark gedrosselt ab.

Es gibt Hinweise dafür, daß sich die Hefezellen unter diesen eingeschränkten Synthesemöglichkeiten auf die Produktion elementarer, lebenserhaltender Enzyme konzentrieren. Von ATWAL et al. wird beschrieben, daß unter Biotinmangel das noch vorhandene Biotin bevorzugt zu lebenswichtigen, biochemischen Funktionen herangezogen wird, während andere Prozesse, die z. B. zu Wachstum und Vermehrung führen, weniger intensiv unterhalten werden.

Diese Einschränkungsmöglichkeit für bestimmte Stoffwechselwege macht verständlich, daß die Hefezellen nach Substitution des essentiellen Vitamins zunächst Aminosäuren und Nukleoprecursor in ausreichender Menge zum Aufbau von RNS und Enzymen synthetisieren müssen. In der initialen, stoffwechselaktiven Phase werden die anfallenden Nukleotide wegen des großen Bedarfes an neu zu synthetisierenden Ribonukleinsäuren offenbar sofort verbraucht, so daß zunächst keine Zunahme dieser Stoffe in den säurelöslichen Extrakten festzustellen ist (vgl. das Verhalten der Triphosphate und UDP-Glukose in Abb. 27 und 28).

Nachdem diese Syntheseleistungen wieder ausgeglichene quantitative Verhältnisse für die bisher fehlenden Zellbestandteile hergestellt haben, sammeln sich auch wieder größere Spiegel der freien Nukleotide an. Es ist in diesem Zusammenhang allerdings auch eine wachstumsbedingte Vergrößerung dieser Pools zu berücksichtigen.

Die erörterten Interpretationen der Versuchsergebnisse werden dadurch zusätzlich gestützt, daß in dieser stoffwechselaktiven Phase, die der G 1-Phase des normalen Zellzyklus zugeordnet werden kann, das quantitative Verhältnis von Tri- zu Diphosphaten sich zugunsten der energiereichen Triphosphate verändert (vgl. Tab. 15 und 16). Die Triphosphatester werden zunächst in stärkerem Maße zur Synthese der RNS und vor allem als Energielieferanten gebraucht. Das gegenläufige Verhalten von Di- und Triphosphaten in Bezug auf ihre Markierung mit ^3H -Uracil muß in gleicher Weise gedeutet werden (vgl. Abb. 27). 30 Minuten nach Biotinzusatz wurde der höchste Wert für den Quotienten ATP zu ADP gefunden. Hier überwiegt offensichtlich die Produktion des Triphosphates den Verbrauch dieser Fraktion. Zu diesem Zeitpunkt setzt die oben beschriebene Drosselung der RNS-Synthese ein (vgl. Abb. 26 B). Dieser Effekt wird durch sofortige Phosphorylierung der Diphosphate zu den energiereichen Triphosphaten verstärkt. Das Verhältnis der Adenosinphosphate zu den entsprechenden Guanosinderivaten verändert sich in dieser Phase deutlich zugunsten der Adenosinnukleotide. Dieser Befund ist wohl durch den nun größeren Bedarf des Adenosintriphosphates für den Energiestoffwechsel zu erklären.

2. Der Übergang zur S-Phase.

Der Übergang aus der G 1- in die S-Phase ereignet sich bei den beschriebenen Versuchen etwa 80 bzw. 170 Minuten nach Biotinzugabe (vgl. Tab. 15 und 16). Hier wird der Spiegel der Diphosphate deutlich angehoben im Vergleich zu den Triphosphaten. Es ist hierfür sicherlich die oben und auch von WILLIAMSON beschriebene Drosselung des RNS- und Energiestoffwechsels kurz vor Beginn der S-Phase

von großer Bedeutung. Es kann jedoch auch diskutiert werden, daß für die zu diesem Zeitpunkt einsetzende Reduktion der Ribonukleotide die relative Zunahme der Diphosphate Voraussetzung ist. Das für diese Reaktion verantwortliche Thioredoxin-System führt die Reduktion auf der Stufe der Diphosphatester durch (REICHARD, 1968). Der Wiederanstieg der Vorpeakfraktion in dieser Phase kann wieder als Vergrößerung der de-novo-Syntheserate für Aminosäuren und Nukleoside gedeutet werden.

Besonders charakteristisch verändert sich vor Beginn der S-Phase das Verhältnis von Adenosin- zu Guanosinderivaten. Es sind hier relativ mehr Guanosinnukleotide vorhanden. Diese Beobachtung findet sich nochmals zu Beginn der zweiten S-Phase nach 360 Minuten (vgl. Tab. 16). Diese Veränderung im Purinnukleotidpool ist außer durch eine Drosselung des Energiestoffwechsels - im Sinne der oben diskutierten Bedeutung von ATP für diesen Vorgang - auch über andere Mechanismen zu erklären:

HAERTEL, 1971, beobachtete zu Beginn der S-Phase hohe ^{14}C -Uracil-Aktivitäten zunächst der D-RNA und kurz darauf besonders der ribosomalen RNA. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Feststellung von DIFFUS, 1971, daß über 80 % der in einem Zellzyklus synthetisierten RNS der Fraktion der ribosomalen Ribonukleinsäure zuzuordnen ist.

In diesem Zusammenhang ist interessant, daß GTP neben den initiierenden Proteinen F_1 und F_2 sowie Magnesiumionen einen wichtigen Faktor für das Zustandekommen des Translationsvorganges darstellt. Dies wird von mehreren Autoren belegt (vgl. KARLSON, 1972, ANDERSON et al., 1967, TORANO et al., 1972, BODLEY et al., 1970, und ALBRECHT et al., 1970). Es kann daher vermutet werden, daß die starke

Zunahme des GTP-Pools vor Beginn der S-Phase durch den Mehrbedarf dieses Nukleotids bei verstärkten Translationsvorgängen verursacht wird. Da für die Synthese der DNS ein quantitativ ausgeglichenes Verhältnis der vier erforderlichen Nukleotide vorliegen muß, ist es auch unter diesem Gesichtspunkt verständlich, daß der Quotient ATP zu GTP in dieser Phase kleiner wird.

REICHARD berichtet im Jahre 1968, daß ein erhöhter Spiegel an ATP, der die Reduktion der Pyrimidinnukleotide initierende Faktor ist. Das Thioredoxinsystem reduziert unter ATP-Einfluß zunächst TDP und CDP zu den entsprechenden Desoxyderivaten. Die gebildeten Pyrimidinderivate selbst fördern dann wieder die Produktion der Purindesoxynukleotide. REICHARD weist auf die allosterisch stark aktivierende Eigenschaft des d-TTP für die Funktion der Diphosphatreduktase hin. Da BJURSELL dem d-CTP-Spiegel eine bedeutende Regulationsfunktion der DNS-Synthese zuschreibt, ist über diesen Aktivierungsmechanismus letztlich auch ATP an der Regulation der DNS-Reduplikation mitbeteiligt.

Die Ergebnisse unserer Versuche zeigen einen deutlichen Anstieg der ATP-Fraktion vor Beginn der S-Phase, der in seiner Steilheit lediglich von der GTP-Synthese übertroffen wird (vgl. Tab. 16). Auch der CTP-Pool verändert sich in dieser Zellzyklusphase deutlich nach oben (vgl. Tab. 15). Es läßt sich hier jedoch keine eindeutige Auswertung der Veränderungen im Pyrimidinstoffwechsel vornehmen, da der CTP-Peak der säulenchromatographischen Trennung auch ITP-Anteile enthält (vgl. Tab. 6).

Die Reduplikation der DNS ist ein noch längst nicht geklärter und überschaubarer Vorgang (vgl. GOULIAN, 1971). Die von KORNBERG beschriebene DNS-Polymerase I ist nach

CHAIRS et al. und DeLUCIA et al. ausschließlich für die Funktion der Repair-Systeme verantwortlich. KNIPPERS et al., 1970, SMITH et al., 1970, sowie MOSES et al., 1970, beschreiben andere DNS-Polymeraseaktivitäten, die Syntheseraten aufweisen, wie sie in vivo während der DNS-Reduplikation beobachtet werden, und an Membranpartikel gebunden sind. Es wird dabei ebenfalls auf die Bedeutung von ATP für die Funktion dieser membrangebundenen DNS-Polymerasen hingewiesen. OKAZAKI et al. stellen in Frage, ob diese Polymerasen direkt Desoxytriphosphatderivate als Ausgangssubstanzen für die DNS-Synthese benötigen. Dieser Hinweis wird von WERNER untermauert. Er stellte nach Auswertung seiner Versuchsergebnisse fest, daß Desoxynukleotidtriphosphate lediglich von Repair-Enzymen verbraucht werden und bisher noch nicht identifizierte, dem Desoxynukleotidmonophosphatpool entstammende Derivate als DNS-Precursor fungieren.

Da wir mit unserer Analysenmethode vorerst die Desoxynukleotide nicht von den Ribonukleotiden abtrennen können, sind an Hand unserer Ergebnisse keine Aussagen zu diesem Problem möglich. Lediglich der starke Abfall der Monophosphatmarkierung der Pyrimidinderivate - relevant ist hier CMP zwischen der 60. und 100. Minute nach Zugabe der Vitamine - also in der Zeit der beginnenden S-Phase, kann als Hinweis auf einen vermehrten Verbrauch dieser Fraktion im oben diskutierten Sinne gewertet werden (vgl. Tab. 17 B und Abb. 28).

Versuch 1 (s. S. 113 und Tab. 15) wurde so aufgearbeitet, daß grundsätzlich alle Hefeextrakte während der Neutralisation für einige Sekunden alkalische pH-Werte erreichten. Daher tritt bei diesem Versuch für alle Proben der Peak 19 auf. Das quantitative Verhalten dieser Fraktion während eines Zellzyklus ist sehr auffällig. Legt man den Wert vor

der Zugabe des Vitamingemisches aus Ausgangswert zugrunde, so wird der Anteil des Peak 19 in der stoffwechselaktiven Phase auf etwa vierfach höhere Werte vergrößert. Nach der DNS-Reduplikation wird nur noch ein doppelt so hoher Gehalt dieser Fraktion gefunden. Da die Zellsuspension zu diesem Zeitpunkt zu 100 % große Sprossen enthält, errechnet sich für Tochter- und Mutterzelle die gleiche Konzentration an Peak 19 wie zu Beginn des Versuches. Bei dem Übergang der Zellen in den zweiten Zyklus steigen die Werte erneut an. In einem Vorversuch für den allerdings nur Hefepollen zu fünf verschiedenen Zeitpunkten eines Vermehrungszyklus geerntet wurden, konnte das gleiche Verhalten dieser Zellfraktion beobachtet werden.

HASELTINE et al. und ABOUD et al. beschreiben die Bedeutung von Guanosintetra- und -pentaphosphaten (MS I und MS II) für die Regulation der RNS- und Proteinsynthese bei *E. coli*. CASHEL et al. stellten schon 1969 an Bakterien fest, daß die Syntheserate der RNS durch eine Akkumulation dieser Polyphosphate stark abgeschwächt wird. 1970 identifizierte CASHEL den Faktor MS I als Guanosin-5'-diphosphat-2'-diphosphat (ppGpp). Der oben beschriebene Peak 19 ähnelt in seinem Absorptionsverhalten im UV-Bereich und vor allem seinen chromatographischen Eigenschaften den Guanosintetra- phosphaten (ppGpp, pppGpp und ppppG) sehr.

Unter der Voraussetzung, daß die oben diskutierte Möglichkeit der Identität zumindest eines Teil des Peak 19 mit Nukleosidtetra- und pentaphosphaten sich als richtig herausstellt, kann der deutliche Anstieg dieser Zellfraktion in der stoffwechselaktiven Phase mit der oben beschriebenen Drosselung der RNS-Synthese vor der S-Phase in Verbindung gebracht werden. Es sind aber weitere Untersuchungen notwendig, um den Zusammenhang dieser charakteristisch fluktuierenden Extraktbestandteile mit der Regulation der RNS- und möglicherweise auch der DNS-Synthese sicher be- weisen zu können.

Neben der diskutierten, quantitativen Veränderung der Nukleotidzusammensetzung muß als zusätzliche Wirkung von Biotin auch seine Bedeutung für die Synthese von physiologisch funktionsfähigen Elementarmembranen (DIXON et al. 1964) und Zellwandmaterialien (DUNWELL et al., 1962, und RUIZ-AMIL et al., 1965) berücksichtigt werden. Es bleibt nach unseren Ergebnissen offen, inwieweit sich Biotinmangel über diese wichtigen Syntheseleistungen auf die Funktionsfähigkeit der membrangebundenen DNS-Polymerasen und die Bedeutung von Membranbausteinen für die DNS-Replikation, im Sinne von COMINGS et al. und LARKS auswirkt. Diese Autoren vermuten, daß ein gewisser Pool an funktionsfähigen Membranpartikeln für den Anstoß zur DNS-Synthese von Bedeutung ist.

Weitere Untersuchungen des Zellzyklus' von Hefezellen werden erforderlich sein, um die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse und diskutierten Mechanismen zu vertiefen und zu erweitern. Dann läßt sich unter Umständen die Frage beantworten, ob die Bedeutung von Biotin für die DNS-Replikation allein von den diskutierten Funktionen als Coenzym wichtiger Stoffwechselwege abhängt oder ob das Vitamin direkt in den Regulationsmechanismus der DNS-Synthese eingreift, ähnlich wie DISON und ROSE dies 1964 für die Synthese der Ornithin-carboxyltransferase postuliert haben.

Die Beobachtung von KERÄNEN im Jahre 1972, daß unter Zusatz von Biotin zur Biotinsynthese fähige Hefe- und Tumorzellen im Wachstum gebremst werden, wenn sie in Mischkultur mit biotinabhängigen Organismen gezüchtet werden, kann als Hinweis für Regulationsfunktionen des Vitamins gedeutet werden.

11. Zusammenfassung

Unter Verwendung von Polyäthyleniminzellulose (PEI-Zellulose) wird ein neues säulenchromatographisches Verfahren zur Trennung und präparativen Gewinnung von Nukleotiden ausgearbeitet. Gegenüber den bisherigen Methoden hat es folgende Vorteile:

1. Innerhalb einer relativ kurzen Durchlaufzeit (ca. 10 bis 15 Stunden) scharfe Trennung von Mono-, Di- und Triphosphaten der Purin- und Pyrimidinnukleotide, von UDP- und ADP-Glukose, Riboflavinphosphaten und Pyrimidinnukleotiden.
2. Eluation mit NaCl- oder LiCl-Gradienten bei neutraler Reaktion und damit Vermeidung von hydrolytischen Spaltungen.
3. Einfache Aufbereitung des Säulenmaterials.
4. Das geringe Eluationsvolumen und die Vermeidung der störenden UV-Absorption der Formiatpuffer.
5. Bei erfahrungsgemäß schlecht aufzutrennenden, säurelöslichen Zellextrakten wie solchen von Hefe scharf abgesetzte Peaks.

Der Abschnitt 7.8. (Seite 61) diskutiert die Anwendbarkeit dieser Methode ausführlich.

Unter Einsatz dieser Methode werden die optimalen Bedingungen für die Gewinnung des säurelöslichen Extraktes aus Hefezellen festgelegt (im Abschnitt 9., auf S. 102, sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefaßt) und dann an biotinfrei, synchron wachsender Hefe die Veränderung des Nukleotidpools nach Zusatz des Vermehrungsfaktors Biotin untersucht.

Etwa 10 Minuten nach Biotinzugabe kommt es in erster Phase zu erhöhter Bildung von Oligonukleotiden und niedermolekularen RNS-Vorstufen unter gleichzeitiger Abnahme zuerst von Tri- und Diphosphaten, dann auch von Monophosphaten. UDP-Glukose steigt an.

Nach wenigen Minuten schließt sich eine 2. Phase an. Sie ist gekennzeichnet durch einen steilen Anstieg der RNS-Bildung, Abfall der niedermolekularen Vorstufen und Wiederanstieg der Nukleotide. Nach Markierung mit ^3H -Uracil ist dabei der Einbau von Nukleotiden in die RNS erhöht, auch UDP-Glukose wird vermehrt verbraucht.

Aus einer veränderten Zusammensetzung der "Vorfraktion", die Basen, Nukleoside und Aminosäuren enthält, wird geschlossen, daß der Veränderung des Nukleotidpools eine solche des Aminosäurepools vorausgeht.

Zu Beginn der S-Phase, in der auch die RNS-Synthese erneut ansteigt, findet sich eine starke Zunahme der Di- und Triphosphate. Der Anstieg des Diphosphatpools verläuft dabei wesentlich steiler. Als Ursache wird die Bedeutung der Diphosphatnukleotide für die Reduktion zu den Desoxyderivaten diskutiert. Der stimulierende Einfluß von ATP auf diesen Syntheseschritt wird hier ebenfalls in Erwägung gezogen.

Gleichzeitig findet sich innerhalb des Triphosphatpools eine relative Zunahme von GTP zu ATP. Für eine Deutung dieses Befundes werden folgende Mechanismen für möglich gehalten.

1. Ein geringerer ATP-Bedarf bei gedrosseltem Energiestoffwechsel und
2. die Bedeutung von GTP für den Translationsvorgang.

Es wird eine Zellfraktion beschrieben, die nach ihrem Eluationsverhalten und den durchgeführten Analysen Nukleosidtetra- und -pentaphosphate enthält. Diese Fraktion steigt zu Beginn der S-Phase auf vierfach höhere Werte an und fällt danach wieder ab. Die Bedeutung von Tetraphosphaten für die Regulation der RNS-Synthese ist beschrieben worden. Nach unseren Ergebnissen kann eine analoge Bedeutung dieser Substanzen für die DNS-Synthese diskutiert werden.

Die Frage, ob die Bedeutung von Biotin für die DNS-Reduplikation allein von seiner Funktion als Coenzym abhängt oder ob das Vitamin direkt in den Regulationsmechanismus der DNS-Synthese eingreift, kann vorerst nicht entschieden werden.

Literaturverzeichnis

1. Aboud, M. and Pastan, I.: Stimulation of lac transcription by Guanosine-5'-Diphosphate 2'(or 3')-Diphosphate and transfer ribonucleic acid, J.Biol.Chem. 248, 3356 - 3358 (1973)
2. Ackermann, W.W. and Kirby, H.: Evidence for the natural occurrence of α -amino- β - β -dimethyl- γ -hydroxy-butyric acid (pantomine), J.Biol.Chem. 175, 483-484 (1948)
3. Ahmad, F. and Rose, A.H.: The role of biotin in the regulation of enzyme synthesis in yeast, Arch.Biochem.Biophys. 97, 302-308 (1962)
4. Albrecht, U., Klink, F., Richter, D.: Isolation of a ribosome dependent guanosine triphosphate from yeast, Z. Naturforsch. 25 b, 285-287 (1970)
5. Anderson, J.S., Dahlberg, J.E., Bretcher, M.S., Revel, M. and Clark, B.F.: GTP-stimulated binding of initiator-tRNA to ribosomes directed by ϕ 2 bacteriophage RNS, Nature 216, 1072-1076 (1967)
6. Arnold, G.: Versuche über das Verhalten von Desoxyribonukleinsäure und Ribonukleinsäure bei Wachstum und Vermehrung von Hefezellen (unter Verwendung des Celloscopes), Med. Diss. Marburg (1963)
7. Atwal, A. S., Roblee, A.R. and Milligan, L.P.: Effects of dietary biotin on liver pyruvate carboxylase and ^{32}p -incorporation into nucleic acids in livers of chicks, J. Nutrition 101, 1555-1562 (1971)
8. Becker, J.M.: Characteristics and control of biotin influx and efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. Diss. Abst. Inst. B, 31, 4876-4877 (1971)
9. Bjursell, G. and Reichard, P.: Effects of thymidine on deoxynucleoside triphosphate pools and deoxyribonucleic acid synthesis in chinese hamster ovary cells, J. Biol. Chem. 248, 3904-3909 (1973)

10. Blattner, F.R. and Erickson, H.P.: Rapid nucleotide separation by chromatography on cation-exchange columns.
Anal. Biochem. 18, 220 - 227 (1972)
11. Bodley, J.W. and Lin, L.: Interaction of E. coli G factor with the 50 S ribosomal subunit,
Nature 227, 60 - 62 (1970)
12. Braun, R.: Charakterisierung von RNA aus synchron wachsender Bäcker-Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) bei Trennung mit der Methylalbumin-Kieselgur (MAK)-Säule
Z. Naturforsch. 30c, 248 - 251 (1975)
13. Braun, R., Schmid, W. und Stossek, K.: Gewinnung synchron wachsender und sich vermehrender Hefezellen,
Z. Naturforsch. 30c, 245 - 247 (1975)
14. Bray, G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter,
Anal. Biochem. 1, 279 - 285 (1960)
15. Bray, G. and Brent, T.P.: Deoxyribonucleoside 5-tri-phosphate pool fluctuations during the mammalian cell cycle.
Biochim. Biophys. Acta 269, 184 - 191, (1972)
16. Brown, Ph. R.: The rapid separation of nucleotides in cell extracts using high pressure liquid chromatography,
J. Chromatog. 52, 257 - 272 (1970)
17. Brown, Ph. R.: Effect of flow rates and the slope of the linear concentration gradient on peak areas in high-pressure liquid chromatography,
J. Chromatog. 57, 383 - 390 (1971)
18. Burton, K.: A study of conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid,
Biochem. J. 62, 315 - 323 (1956)
19. Burzio, L. and Koide, S.S.: In vitro effect of NAD on DNA synthesis in isolated nucleic from regenerating rat liver and Novikoff hepatoma.
FEBS Letters, 20, 29 - 32 (1972)
20. Caldarera, C.M., Puddu, P. and Marchetti, M.: Biotin and nucleotide metabolism of rat liver,
Ital. J. Biochem. 16, 1, (1967)

21. Caldwell, I.C.: Ion-exchange chromatography of tissue nucleotides,
J. Chromatog. 44, 331-341 (1969)
22. Carisano, A., Riva, M. and Bonchecchi, A.:
Rapid column chromatographic determination of ribonucleotides in soup preparations,
J. Chromatog. 40, 386-392 (1969)
23. Cashel, M. and Gallant, J.: Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*,
Nature 221, 438-441 (1969)
24. Cashel, M. and Kalbacher, B.: The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*,
J. Biol. Chem. 245, 2309-2318 (1970)
25. Chairs, J. and Davern, C.J.: The mechanics of DNS replication in bacteria,
J. Cell Physiol. 70 Sup. 1, 65-76 (1967)
26. Christianson, D.D., Paulis, J.W. and Wall, J.S.:
Ion exchange chromatography of nucleotides on polyethyleneimine cellulose columns. Analysis of Maize grain extracts.
Anal Biochem. 22, 35-46 (1968)
27. Cohen, S. S.: Observations on the estimation of deoxy-ribose nucleic acid,
J. Biol. Chem. 156, 691-702 (1944)
28. Cohn, W.E.: The anion-exchange separation of ribonucleotides.
J. Am. Chem. Soc. 72, 1471-1478 (1950)
29. Cohn, W.E. and Bollum, F.J.: Chromatography and desalting of nucleotides with ammonium bicarbonate on anion-exchange columns,
Biochim. Biophys. Acta 48, 588-590 (1961)
30. Comings, D.E. and Kakafuda, T.: Initiation of deoxy-ribonucleic acid replication at the nuclear membrane in human cells.
J. Mol. Biol. 33, 225-229 (1968)
31. Consden, R., Gordon, A.H. and Martin, A.J.P.:
Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper.
Biochem. J. 38, 224-232 (1944)
32. Coper, H., Herken, H., Koransky, W.: Wiederherstellung der krampfhindernden Wirkung der Hexachlor-cyclohexane durch Adenosintetraphosphat.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak., 235, 464-472 (1959)

33. Davidek, J., Velisek, J., Grundová, K. and Janicek, G.:
Nukleinsäuren in tierischen Geweben.
Z. Lebensmitt.-Untersuch. 146, 83-86 (1971)
34. Dehner, R.: Über das Verhalten der Phosphopyridin-
nukleotide der Hefe bei Vermehrung und Ver-
mehrungshemmung.
Med. Diss. Marburg 1966
35. Diffus, J.H.: The cellcycle in yeast - a review,
J.Inst. Brew. 77, 500-508 (1971)
36. Dische, Z.: Über einige neue charakteristische Farb-
reaktionen der Thymonukleinsäure und eine
Mikromethode zur Bestimmung derselben in
tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktion.
Mikrochemie 8, 4-32 (1930)
37. Dixon, B. and Rose, H.: On the synthesis of ornithine
caramoyltransferase in biotin-deficient
Saccharomyces cerevisiae.
J. gen. Microbiol. 34, 229-240 (1968)
38. Dixon, B. and Rose, A.H.: Observations on the fine
structure of *Saccharomyces cerevisiae*
as affected by Biotin deficiency.
J. gen. Microbiol. 35, 411-419 (1964)
39. Dougherty, Th.M. and Shepartz, A.J.: Desalting of nucleic
acid hydrolysates, nucleosides and bases by
chromatography on poly-N-vinyl-pyrrolidone.
J. Chromatog. 40, 299-230 (1969)
40. Drobishev, V.J., Mansurova, S.E. und Kulaev, I.S.:
Quantitative Analyse von Nukleosid-5'-mono-
di- und triphosphaten in Mitochondrien mit
Hilfe des Flüssigkeitschromatographen,
J. Chromatog. 69, 317-324 (1972)
41. Dunwell, J.L., Ahmad, F. and Rose, A.H.:
Changes in the polysaccharide composition
of yeast resulting from biotin deficiency,
Biochim. Biophys. Acta, 51, 604-607 (1961)
42. Eckstein, H., Paduch, V. und Hilz, H.: Teilungssyndromi-
sierte Hefezellen, II. Enzymsynthese nach
Hemmung der Zellteilung durch Röntgenstrah-
len, Biochem. Z. 344, 435-445 (1966)
43. Eckstein, H.: Acid-soluble deoxynucleotides and DNA
synthesis in growing yeast after X-irradiation
I. Diphenylamine positive material in
synchronized and asynchronously growing Cells,
Z. Naturforsch. 26b, 1266-1270 (1971)

44. Fink, K. and Adams, W.S.: Paper chromatographic data for purines, pyrimidines and derivatives in a variety of solvents,
J. Chromatog. 22, 118-129 (1966)
45. Fischer, E. und Schmidmer, E.: Über das Aufsteigen von Salzlösungen in Filtrierpapier.
Liebigs Ann. Chem. 272, 156-169 (1892)
46. Freund, K.: Das Verhalten von Nukleinsäuren und Protein in der Hefezelle während der Beeinflussung der Zellvermehrung durch Pharmaka.
Med. Diss. Marburg (1963)
47. Geibel, U.: Die Beeinflussung von Biosynthese und Umsatz der Nukleinsäuren in der Leber durch induzierende Pharmaka.
Med. Diss. Marburg (1971)
48. Gerlach, E., Dreisbach, R.H. and Deuticke, B.: Paper chromatographic separations of nucleotides, nucleosides, purines and pyrimidines.
J. Chromatog. 18, 81-85 (1965)
49. Goulian, M.: Biosynthesis of DNA, Ann. Rev. Biochem. 40, 855-897 (1971)
50. Haertel, R.: Untersuchungen über den Status von Nukleinsäurefraktionen bei Wachstum und Vermehrung von Hefezellen nach Trennung über die Methylalbumin-Kieselgur(MAK)-Säule.
Med. Diss. Marburg (1971)
51. Hanes, C.C., and Isherwood, F.A.: Separation of the phosphoric esters on the filterpaper chromatogram.
Nature 164, 1107-1112 (1949)
52. Haseltine, W. A., Block, R., Gilbert, W. and Weber, K.: MSI and MSII made on ribosome in adling step of protein synthesis,
Nature 238, 381-384 (1972)
53. Helfferich, F.: Ion-Exchange Chromatography.
Advan. Chromatog. 1, 3-60 (1965)
54. Hennig, W.: Kalziumphosphat als Adsorbens und seine Anwendung zur säulenchromatographischen Trennung von Ribonukleinsäuren.
Med. Diss. Marburg (1971)

55. Hilz, H. und Eckstein, H. Teilungssynchronisierte Hefezellen I,
Biochem. Z. 340, 351-382 (1964)
56. Hurlbert, R. B., Schmitz, H., Brumm, A.F. and Potter, van R.:
Nucleotide metabolism. II. Chromatographic
separations of acid-soluble nucleotides,
J. Biol. Chem. 209, 23-39 (1954)
57. Jones, C.E., Parkner, J.C. and Smith, E.E.:
Determination of myocardial acid-soluble
nucleotides on anion-exchange thin-layers.
J. Chromatog. 64, 378-382 (1972)
58. Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie,
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 8. Ausgabe
S. 122 ff. (1972)
59. Keränen, A.J.A.: The biotin synthesis of Hela cells in
vitro,
Cancer Research 32, 119-124 (1972)
60. Klouwen, H.M.: The separation of nucleotides from acid-
soluble tissue extracts by high-voltage
paper electrophoresis.
J. Chromatog. 7, 216-222 (1962)
61. Knippers, R. and Strätling, W.: The DNA replicating
capacity of isolated E. coli cell-wall-
membrane complexes,
Nature 226, 713-717 (1970)
62. Kunz, W.: Persönliche Mitteilung.
63. Kunz, W., Schmid, W., Siess, M.: Die Bestimmung von Adenin-
nukleotiden und Hexosephosphateestern in
Gewebeextrakten.
Z. f. ges. exp. Med. 130, 328-342 (1958)
64. Langbehn, J.: Der RNS-Stoffwechsel von Hefe (*Saccharomyces
cerevisiae*) unter Wachstums- und Vermehrungs-
bedingungen,
Med. Diss. Marburg (1972)
65. Larks, K.G.: Initiation and control of DNA synthesis.
Ann. Rev. Biochem. 38, 569-604 (1969)
66. Lerner, J. R. and Shepartz, A.J.: Chromatographic sepa-
ration of biologically important phosphate
esters.
J. Chromatog. 35, 37-42 (1968)

67. Lerner, J.R., Dougherty, Th. M. and Shepartz, A.J.: Selectivity properties of poly-N-vinylpyrrolidone in column chromatography of nucleotides, their derivatives and related compounds: A preliminary report. *J. Chromatog.* 37, 453-457 (1968)
68. De Lucia, P. and Chairs, J.: Isolation of a *E. coli* strain with a mutation affecting DNA polymerase. *Nature*, 224, 1164-1166 (1969)
69. Lust, J. and Sahud, M.A.: Contributions of anion-exchange thin-layer chromatography of the study of free nucleotides in tissues. *J. Chromatog.* 71, 127-133 (1972)
70. Martin, A.J.P. and Synge, R.L.M.: Separation of the higher mono-amino-acids by counter-current liquid-liquid extraction: The amino-acid composition of wool. *Biochem. J.* 35, 91-121 (1941)
71. Martin, A.J.P. and Synge, R.L.M.: A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochem. J.* 35, 1358-1368 (1941)
72. Mejbaum, W.: Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen in Derivaten der Adenylsäure. *Z. Phys. Chem.* 258, 117 (1939)
73. Michl, H.: Hochvoltelektrophoresis, *J. Chromatog.* 1, 93-121 (1958)
74. Mitchison, J. M. and Creanor, J.: Induction synchrony in the fission yeast *Schizosaccharomyces pompe*. *Exp. Cell Research* 67, 368-374 (1971)
75. Mitchison, J. M. and Creanor, J.: Further measurements of DNS synthesis and enzyme potential during cell cycle of *Chizosaccharomyces pompe*. *Exp. Cell Research* 69, 244-247 (1971)
76. Moat, A.G. and Friedmann, A.: The biosynthesis and interconversion of purines and their derivatives, *Bacteriol. Rev.* 24, 309-339 (1960)
77. Moat, A.G. and Ahmad, F.: Biosynthesis and interrelationships of amino acids in yeast. *Wallerstein Lab. Commun.* 28, 111-136 (1965)

78. Moat, A.G., Ahmad, F., Alexander, J.K. and Barnes, I.J.: Alterations in the amino acid content of yeast during various nutritional conditions *J. Bacteriol.* 98, 573-578 (1969)
79. Moses, R.E. and Richardson, Ch.C.: Replication and repair of DNA in cells of *Escherichia coli* treated with toluene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 674-681 (1970)
80. Munch-Petersen, A. and Neuhard, H.: Accumulation of deoxyadenosine triphosphate in *Escherichia coli* 15 T-A-U. *Biochim. Biophys. Acta* 80, 542-551 (1964)
81. Neuhard, J. and Munch-Petersen, A.: Changes in the amounts of deoxycytidine triphosphate and deoxyadenosine triphosphate in *Escherichia coli* 15 T-A-U. *Biochim. Biophys. Acta* 114, 61 - 71 (1966)
82. Neuhard, J. : On the regulation of the deoxyadenosine triphosphate and deoxycytidine triphosphate pools of *Escherichia coli* 15 T-A-U. *Biochim. Biophys. Acta* 129, 104-115 (1966)
83. Okazaki, R., Sugimoto, K., Okazaki, R., Imae, Y. and Sugino, A.: DNA chain growth: In vivo and in vitro synthesis in a DNA polymerase negative mutant of *E. coli*, *Nature* 228, 223-226 (1970)
84. Overend, W.G., Shafizadeh, F. and Stacey, M.: Deoxy-sugars. Part XI Further observations on the Dische reaction for 2-deoxypentose. *J. Chem. Soc.* 1950, Part II, 1027-1029
85. Overend, W.G.: Deoxy-sugars. Part XX: The value of the Dische-test for the quantitative determination of deoxypentose nucleic acids. *J. Chem. Soc.* 1951 Part II, 1484-1487.
86. Pankotsch, K.: Isolierung und Wirkungsweise eines Wachstumsfaktors (Biotin) aus Extrakten von Bäckerhefe. *Med. Diss. Marburg* (1969)
87. Pataki, G.: Thin-layer chromatography of nucleic acid bases, nucleosides, nucleotides and related compounds. III. Separation of complex mixtures on cellulose layers, *J. Chromatog.* 29, 126-132 (1967).

88. Pataki, G.: Thin-layers chromatography of nucleic acid bases, nucleosides, nucleotides and related compounds. IV. Separation on PEI-cellulose layers using gradient elution and direct fluorometry of spots, *J. Chromatog.* 29, 133 - 141 (1967)
89. Randerath, K.: Dünnschichtchromatographie von Nukleinsäurederivaten an Anionenaustauscher-Schichten. *Angew. Chem.* 73, 436 (1961)
90. Randerath, K.: Thin-layer chromatography of nucleotides on layers of cellulose ion-exchangers. *Nature* 194, 768-769 (1962)
91. Randerath, K.: Polyäthylenimin-Zellulose - ein neuer Anionenaustauscher für die Chromatographie von Nukleotiden *Biochim. Biophys. Acta* 61, 852-854 (1962)
92. Randerath, K.: Chromatography of nucleotides on a new anion-exchange paper, *J. Chromatog.* 10, 235-236 (1963)
93. Reichard, P.: The biosynthesis of deoxyribonucleotides. *European J. Biochem.* 3, 259-266 (1968)
94. Reinauer, H., und Bruns, F.H.: Hochspannungselektrophoretische Trennung von Nukleosiden und ihnen entsprechenden Basen in Boratpuffer, *J. Chromatog.* 19, 453-455 (1965).
95. Reyes, Ph.: PEI-cellulose thin layer chromatography: A highly versatil system for separating purine and pyrimidine nucleotides from nucleosides and free bases, *And. Biochem.* 50, 35-39 (1972).
96. Ricceri, G.: Giuffrida, A.M. and Cantone, B.: Incorporation of ¹⁵N into nucleic acid bases in the liver of rats deprived of biotin. *Ital. J. Biochem.* 10, 563 (1961)
97. Ruiz-Amil, M.; De Torrentegui, G., Palacian, E., Catalina, L. and Losada, M.: Poperties and function of yeast pyruvate carboxylase, *J. Biol. Chem.* 240, 3485-3492 (1965).
98. Runge, F.: Dissertation 1822
99. Runge, F.: Der Bildungstrieb der Stoffe, Oranienburg 1855.

100. Rustum, Y.M. and Schwartz, H.S.: Methods for the separation and identification of ribonucleotides on DEAE-cellulose.
Anal. Biochem. 53, 411 - 419 (1973)
101. Schoenbein, C.F.: Über einige durch die Haarröhrchenanziehung des Papiers hergebrachte Trennungswirkungen.
Poggendorfs Ann. Phys. 114, 275-280 (1861)
102. Scholz, R.: Über die Wirkung von Nystatin auf Bäckerhefe.
Med. Diss. Marburg (1960)
103. Schott, H., Rudolf, E., Schmidt, P., Roychoudhury, R. and Kössel, H.:
A dihydroxyboryl-substituted methacrylic polymer for the column chromatographic separation of mononucleotides, oligonucleotides and transfer ribonucleic acid.
Biochemistry 12, 932-938 (1973)
104. Shapiro, H.S.: The preparation of pyrimidine Oligonucleotides by acid hydrolysis of DNA,
Methods in enzymology, Vol. XII (25)
Academic Press, Inc. New York (1968), S.205 ff.
105. Silver, M.J., Rodalewicz, J., Duglas, Y. and Park, D.:
High-voltage paper electrophoresis of nucleotides.
Anal. Biochem. 36, 525-527 (1970)
106. Simon, E.J. and Shemin, D.: The preparation of succinyl-coenzyme A,
J. Am. Chem. Soc. 75, 2520 (1953)
107. Smith, D.W., Schaller, H.E. and Bonhoeffer, F.J.:
DNA synthesis in vitro,
Nature 225, 711-713 (1970).
108. Stadtman, E. R.: The net enzymatic synthesis of acetyl coenzyme A.,
J. Biol. Chem. 196, 535-546 (1952)
109. Stosseck, W.: Differenzierung von Wachstum und Vermehrung an synchronisierten Hefezellen.
Med. Diss. Marburg (1966)
110. Sweetman, L. and Nyhan, W.L.: Sephadex G-10 adsorption chromatography of purines and related compounds.
J. Chromatog. 32, 662-675 (1968).

111. Torano, A., Sandoval, A., Sanjosé, C. and Heredia, C.F.: A soluble factor from yeast which promotes a GTP-dependent binding of N-acetylphenyl-alanyl-tRNA to the ribosomes. *Febbs Letters* 22, 11-14 (1972)
112. Vanderheiden, B.S.: Separation of deoxyribonucleotides from ribonucleotides by paper chromatography. *Anal. Biochem.* 22, 231-237 (1968).
113. Varma, K.G. and Mistry, S.P.: Incorporation of glycine into nucleic acid purines of biotin-deficient rats. *Federation Proc.* 25, 784 (1966)
114. Wasternack, C. und Reinbothe, H.: Trennung von Nukleinsäurebausteinen an Sephadex G-10. *J. Chromatog.* 48, 551-555 (1970)
115. Wellner, V. P., Santos, J.J. and Meister, A.: Carbamyl phosphate synthetase. A biotin enzyme. *Biochemistry*, 7, 2848-2851 (1968)
116. Werner, R.: Nature of DNA precursors, *Nature New Biol.* 233, 99 - 103 (1971)
117. Williamson, D.H. and Scopes, A.W.: The behaviour of nucleic acids in synchronously dividing cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Exptl. Cell Research* 20, 238-249 (1960)
118. Williamson, D.H.: The timing of deoxyribonucleic acid synthesis in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* 25, 517-528 (1965).
119. Wieland, T. und Fischer, E.: Über Elektrophorese auf Filtrierpapier; Trennung von Aminosäuren und ihren Kupferkomplexen. *Naturwiss.* 35, 29-30 (1948).
120. Woodland, H.R., Pestell, R.Q.W.: Determination of the nucleoside triphosphate contents of eggs and oocytes of *Xenopus laevis*. *Biochem. J.* 127, 597-605 (1972).
121. Wortberg, W.: Trennung vermehrungsanregender Stoffe aus Hefeextrakten von *Saccharomyces cerevisiae*. *Med. Diss. Marburg* (1968)

Am Schluß dieser Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. W. Schmid für die freundliche Überlassung des Themas, seinen Rat in fachlichen und persönlichen Belangen sowie sein jederzeit verständnisvolles Entgegenkommen herzlich danken.

Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. W. Kunz für die zahlreichen, fruchtbaren Diskussionen und für die Übernahme des Correferates.

Frau H. Radler danke ich für die gewissenhafte, technische Assistenz.

Lebenslauf

Am 15.3.1948 wurde ich als ältester Sohn des Landwirts Johannes Pflüger und seiner Ehefrau Martha Pflüger, geb. Zinn, in Homberg/Efze geboren.

Zu Ostern 1954 wurde ich in die einklassige Volksschule in Wallenstein eingeschult und wechselte im Frühjahr 1958 auf das Gymnasium, die jetzige Bundespräsident-Theodor-Heuss-Schule, nach Homberg über. Dort legte ich am 3. November 1966 die Reifeprüfung ab.

Am 1.12.1966 begann ich meine pharmazeutische Ausbildung als Praktikant in der Stadt-Apotheke in Treysa. Nach bestandener pharmazeutischer Vorprüfung am 24.9.1968 in Kassel nahm ich zum Wintersemester 1968/69 das Pharmaziestudium an der Philipps-Universität Marburg auf. Am 12. Oktober 1971 legte ich das pharmazeutische Staatsexamen ab und erhielt am 24. November 1971 die Approbation als Apotheker.

Vom Wintersemester 1971/72 bis zum Sommersemester 1974 absolvierte ich in Marburg ein Ergänzungsstudium der Humanbiologie mit dem Hauptfach Pharmakologie. Um meine pharmakologische Ausbildung abzurunden, schrieb ich mich zum Wintersemester 1972/73 für Humanmedizin ein und legte am 25.3.1973 die ärztliche Vorprüfung ab.

Im März 1972 begann ich mit den experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg, wo ich seit Februar 1974 die Stelle eines wissenschaftlichen Mitarbeiters inne habe.

Am 14. Januar 1972 heiratete ich die Arzthelferin Christa Eckhardt.

Marburg, im Juni 1975

Meine akademischen Lehrer waren:

Amon, Bock, Böhme, Bode, Braasch, Braun, Buchholz,
Daume, Dimroth, Dombrowski, Ebel, Eschenbach, Exner,
Friedrich, Gallwitz, Ganz, Gerdes, Golenhofen,
Gottesbühren, Haake, Haberich, Hamelmann, Hardewig,
Hartke, Havemann, Heene, Hennessen, Hensel, Hering,
Heß, Hilgermann, Hildebrandt, Huch, Jacob, Ihm,
Kaffarnik, Kalbfleisch, Karlson, Kating, Kirmse, Klaus,
Kleine, Kleinsasser, Koecke, Koransky, Kunz, Langner,
Lauer, Linneweh, List, Lorenz, Mannheim, Martini,
Maroske, Neurath, Nöth, Nultsch, Petry, Pollmann, Popp,
Portig, Pots, Riecken, Rodeck, Rohen, Sauer, Schaum-
löffel, Schiff, Schleyer, Schmid, Schmitz, Schmitz-
Moormann, Schneider, Seidel, Seifart, Seitz, Siegert,
Siess, Stock, Straub, Stuke, Thoenes, Unterhalt, Vogel,
Waller, Welge-Lüssen, Willenbockel, Willuhn.

